



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**EFFECTO DE LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN SOBRE  
LA DENSIDAD DE LA MICROGLIA EN EL HIPOCAMPO DE RATA**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA**

**MAYRA MACEDO MENDOZA**

**ASESOR**

**DR. DANIEL REYES HARO (INB-UNAM)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN (INB-UNAM)**

**DR. GERARDO B. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ (INPRFM)**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO; SEPTIEMBRE, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: **Mayra Macedo Mendoza**, cuyo título es: “**Efecto de la anorexia inducida por deshidratación sobre la densidad de la microglia en el hipocampo de rata**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

**Dra. Maricela Luna Muñoz**

Secretario (Tutor)

**Dr. Daniel Reyes Haro**

Vocal

**Dra. Mónica López Hidalgo**

Suplente

**Dra. María Teresa Morales Guzmán**

Suplente

**Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez**

Aprobado por el Comité Académico

---

Dra. Maricela Luna Muñoz  
Coordinador del Programa

## RESUMEN

La anorexia nerviosa es un trastorno del comportamiento alimentario con alta prevalencia durante la adolescencia, acompañado de una reducción voluntaria de la ingesta de alimentos y que se ha asociado con un aumento de citocinas pro-inflamatorias periféricas. En los centros hipotalámicos, la activación de la microglia es responsable de la anorexia y la pérdida de peso corporal. Sin embargo, se desconoce si la condición anoréxica aumenta la respuesta pro-inflamatoria en otras regiones del cerebro. Mediante el modelo de anorexia inducida por deshidratación (AID), se ha mostrado una mayor densidad de astrocitos reactivos en el hipocampo de la rata, lo que sugiere un entorno pro-inflamatorio en el que la microglia podría desempeñar un papel importante. El objetivo de este estudio fue determinar si la AID aumenta la densidad de la microglia, con base en la cuantificación de elementos celulares positivos a Iba-1, así como la expresión de citocinas que inhiben la alimentación incluyendo al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 6 (IL-6). La AID aumentó significativamente la densidad microglial en CA2-CA3 y giro dentado (DG) pero no en CA1. Aunado a ello, la relación microglia activada/en reposo aumentó significativamente en CA2-CA3 y DG. Finalmente, el análisis por Western blot mostró que la AID produce una expresión aumentada de Iba-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 en el hipocampo. Concluimos que la anorexia aumenta la respuesta microglial y proinflamatoria en el hipocampo de ratas hembras jóvenes.

## **ABSTRACT**

Anorexia nervosa is an eating disorder with high prevalence during adolescence, accompanied by a voluntary reduction of food intake and is associated with increased peripheral inflammatory cytokines. In hypothalamic centers, microglia activation is responsible for anorexia and body weight loss. Whether the anorexic condition increases pro-inflammatory response in other brain regions is unknown. By using the dehydration induced anorexia (DIA) model, an increased reactive astrocyte density has been shown in the rat hippocampus of the rat, suggesting a pro-inflammatory environment where microglia may play an important role. The aim of this study was to test if DIA increases microglia density, as detected by Iba-1, and expression of cytokines known to inhibit feeding such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6), in young female rats. DIA significantly increased microglial density in CA2-CA3 and dentate gyrus (DG) but not in CA1. In addition, the activated / resting microglia ratio increased significantly in CA2-CA3 and DG. Finally, Western blot analysis showed that DIA produced an increased expression of Iba-1, TNF- $\alpha$  and IL-6 in the hippocampus. We conclude that anorexia increases the microglial / proinflammatory response in the hippocampus of young female rats.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a la UNAM por el apoyo recibido para el financiamiento del proyecto PAPIIT-UNAM (IN200913, IN201915) que permitió la realización del presente trabajo de investigación y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) del cual tuve el beneficio de ser becaria (612313), apoyo sin el cual hubiera sido muy difícil mi permanencia en el programa de estudios.

Agradezco al Instituto de Neurobiología de la UNAM y al laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular por abrirme sus puertas desde antes que soñara con estudiar la maestría, recibíendome calurosamente en veranos de investigación previos a ésta y por ser los lugares que me han formado en esta trayectoria para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

Agradezco especialmente a la Ing. Nydia Hernández-Ríos de la Unidad de Microscopía por su gran ayuda para el manejo de los diferentes equipos de la unidad que me permitieron lograr la captura de imágenes que forman parte importante del trabajo de investigación que presento; así como a la Biol. Ma Eugenia Ramos-Aguilar del laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología por su calidez y apoyo para la realización de las inmunos y el FluoroJade C que integran este trabajo. Además, a la Dra. Alejandra Castilla y el MVZ Martín García-Servín del Bioterio, por su ayuda en el cuidado de los animales que formaron parte de este proyecto de investigación.

Agradezco a mis tutores el Dr. Daniel Reyes-Haro, la Dra. María Teresa Morales-Guzmán y el Dr. Gerardo B. Rodríguez-Ramírez por su paciencia y dedicación en mi formación académica, así como por su contribución para las mejoras en mi tesis.

Al Dr. Ataulfo Martínez-Torres, la M. en C. E. Espino-Saldaña, la Lic. Ma de Lourdes Lara-Ayala y M. en C. Leonor Casanova-Rico, por el apoyo recibido tanto técnico como administrativo.

Finalmente, agradezco a mis profesores de clases por su entrega en el aula y por ser parte fundamental en mi formación académica mediante su visión de las neurociencias.

## **DEDICATORIAS**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Conducta Alimentaria.....	1
1.2 Ingesta de Alimento y Peso Corporal.....	3
1.3 Circuito Hambre-Saciedad.....	4
1.4 Anorexia.....	7
1.5 Modelos Experimentales de Anorexia.....	10
1.6 Anorexia Inducida por Deshidratación.....	13
1.7 Alteraciones del Circuito Hambre-Saciedad en Anorexia Inducida por Deshidratación.....	15
1.8 Anorexia e Hipocampo.....	16
1.9 Hipocampo.....	17
1.10 La Glia.....	20
1.11 La Glia y su Papel en la Ingesta de Alimento.....	22
1.12 Investigación de la Microglia.....	22
1.13 Funciones Fisiológicas de la Microglia.....	22
1.13.1 Motilidad del Proceso Microglial.....	29
1.13.2 Quimiotaxis Microglial.....	32
1.13.3 Fagocitosis Microglial.....	32
1.13.4 Influencias Funcionales sobre la Actividad Neuronal.....	32
1.14 Citocinas Pro-Inflamatorias y Anorexia.....	22
1.15 Neuroinflamación.....	23
1.16 Comunicación Sistema Nervioso Central – Sistema Inmune.....	24
1.17 Influencia de Citocinas en el SNC.....	42
1.17.1 IL-6.....	42
1.17.2 TNF- $\alpha$ .....	45
1.18 Glia y Neuroinflamación.....	48
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>49</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>50</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>50</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>51</b>
5.1 Objetivo General.....	51
5.2 Objetivos Específicos.....	51
<b>6. Material y Métodos.....</b>	<b>51</b>
6.1 Animales Experimentales.....	51
6.2 Modelo de Anorexia Inducida por Deshidratación.....	51
6.3 Histología.....	52
6.4 Inmunohistofluorescencia.....	52
6.5 Conteo Celular.....	53
6.6 Análisis de Proteínas por Western blot.....	54



6.6.1 Extracción de Proteínas.....	54
6.6.2 Electroforesis y Transferencia de Proteínas.....	54
6.6.3 Inmunodetección.....	55
6.6.4 Fluoro Jade.....	55
<b>7. Resultados.....</b>	<b>56</b>
7.1 Monitoreo de Peso y Consumo de Alimento.....	56
7.2 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia en el Hipocampo.....	57
7.2.1 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia en CA1.....	58
7.2.2 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia en CA2-CA3.....	60
7.2.4 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia en GD.....	63
7.3 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia en Reposo y Reactiva.....	66
7.3.1 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia de la Microglia en Reposo y Reactiva en CA1.....	67
7.3.2 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia de la Microglia en Reposo y Reactiva en CA2-CA3.....	68
7.2.4 Efecto de la Anorexia Sobre la Densidad de la Microglia de la Microglia en Reposo y Reactiva en GD.....	70
7.4 Efecto de la Anorexia Sobre la Expresion de Iba-1, IL-6 y TNF-alfa en el Hipocampo.....	72
<b>8. Discusión.....</b>	<b>74</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>78</b>
<b>10. Referencias.....</b>	<b>79</b>
<b>11. Apéndices.....</b>	<b>90</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

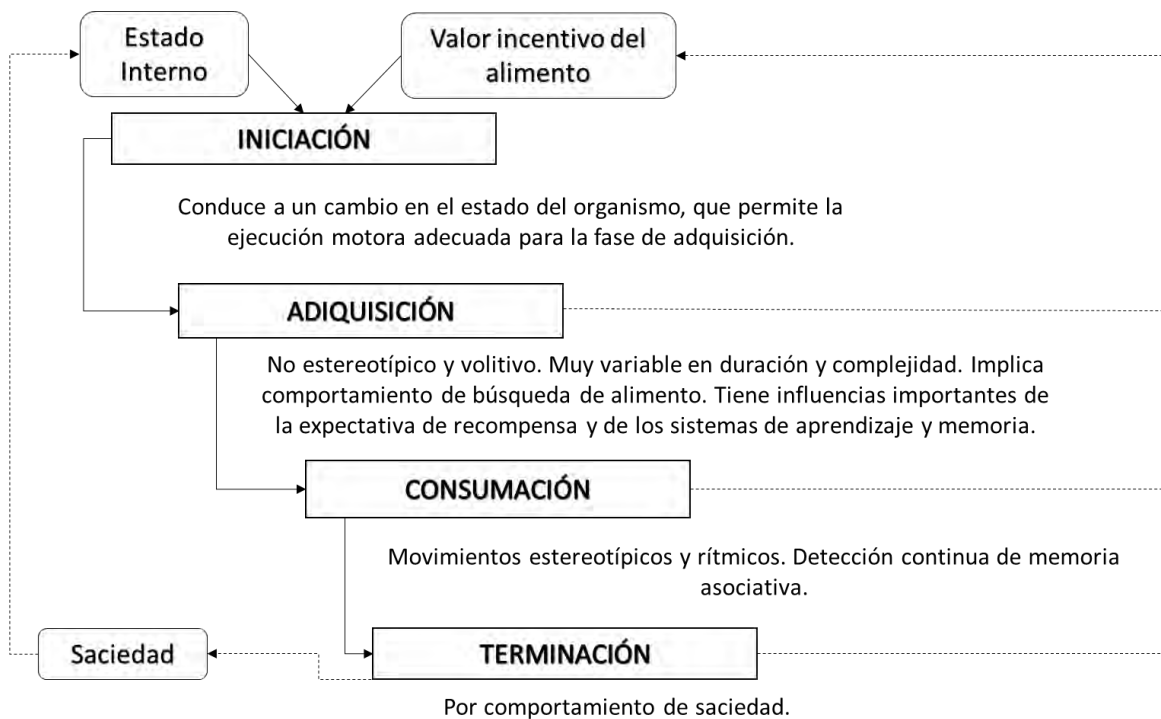
## 1.1 CONDUCTA ALIMENTARIA

La alimentación es un acto cotidiano que forma parte de las necesidades básicas del organismo para ayudarlo a mantener un equilibrio energético y un peso corporal constante, y es resultado de la integración de una serie de factores que se cree que se regulan a nivel del hipotálamo, el cual se encuentra estratégicamente ubicado en medio del neuraxis de los mamíferos y recibe al menos tres tipos distintos de información relevante a través de conexiones neurales directas o indirectas, así como por receptores de hormonas y sensores de sustrato en neuronas hipotalámicas. Sin embargo, algunos estudios han discutido que los mecanismos neurales de la ingesta de alimentos y la regulación del peso corporal van mucho más allá del hipotálamo, y en gran medida involucran circuitos específicos del cerebro anterior y posterior (Berthoud, 2002). Lo anterior es evidenciado al analizar las diferentes fases de la conducta alimentaria que guían el acto de comer, donde es claro que existe una gran participación de estímulos sensoriales y de memoria en los cuales participan dichos circuitos, y se demuestra que la alimentación se lleva a cabo a través de una "red de alimentación" compleja que ocupa una posición y organización neuronal estratégica y es parte integral dentro del sistema nervioso.

Por ejemplo, estudios en primates y de neuroimagen funcional en humanos reportaron que la corteza cerebral percibe las características sensoriales de los alimentos como el olor, el sabor y la textura, además, de que factores cognitivos como lo es una etiqueta de una palabra presentada con un olor, influyen en qué tan agradable resultan y en la activación de la corteza (Rolls, 2006). En cambio, otras regiones como el núcleo arcuato del hipotálamo (NARC) y el núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco encefálico, son susceptibles a factores circulantes como las hormonas sintetizadas en el aparato digestivo; las cuales por lo general regulan la ingesta de alimentos, en función a la distensión gástrica (Chaudhri et al., 2006).

La conducta alimentaria se ha dividido en diferentes fases utilizando criterios conductuales o neurológicos. Watts ha proporcionado una descripción detallada acerca de éstos (Watts, 2000) (Fig.

1). En primer lugar, durante la fase de iniciación se otorga un valor incentivo a un alimento (si está presente) y/o el estado interno hace posible que el organismo dirija su atención a éste. En esta fase la presencia de estímulos directos de los alimentos, como la vista y el olfato, pueden ser suficientes para iniciar la conducta de ingestión sin ayuda del estado interno. Por otro lado, en ausencia de dichos estímulos, se cree que el estado interno facilita de manera selectiva la recuperación de representaciones de los alimentos a través de la memoria. Una vez que se logra la atención selectiva y el impulso hacia la ingesta de alimentos es alto, el sujeto comienza la fase de adquisición; que en los animales, puede implicar una intensa y prolongada búsqueda de alimento, como sucede con las cabras que descienden cientos de millas de las montañas para encontrar sal cerca de la orilla de los ríos. Dicho comportamiento requiere planificación, aprendizaje y memoria, y depende en gran medida del procesamiento cognitivo cortical. Posteriormente, la fase de consumación comienza cuando los alimentos están finalmente presentes y son ingeridos. Aunque esta fase implica muchos movimientos estereotípicos, también se caracteriza por la detección continua de los alimentos ingeridos y sus nutrientes constituyentes a nivel cefálico y gastrointestinal, así como la generación de asociaciones entre varios atributos sensoriales. Además, los mecanismos de saciedad entran en acción, lo que finalmente conduce a la finalización de la alimentación.



**Fig. 1. Fases de la Conducta Alimentaria (Adaptado de Berthoud, 2002).** En la fase de iniciación, señales internas como la disponibilidad de energía y/o el valor de incentivo de los alimentos (recordado por señales

condicionadas, vistos u olidos agudamente) se combinan para producir el estímulo para comer. Si hay comida presente, la consumación puede comenzar de inmediato. De lo contrario, el sujeto planifica y ejecuta la búsqueda del alimento deseado durante la fase de adquisición. Durante y después de la consumación, asociaciones sensoriales (por ejemplo, entre el sabor y efectos posabsorción) se almacenan en la memoria. El consumo se detiene cuando las señales de saciedad alcanzan un cierto nivel y/o cuando se recuerda información almacenada (saciedad aprendida), o cuando otro comportamiento se vuelve más importante. El sujeto puede proceder a ingerir otro alimento o a tener un período de saciedad estable hasta la próxima comida.

Además, en un sentido neurológico, la finalización de la comida no es el final de la conducta alimentaria, sino que se recopila información importante sobre las consecuencias absortivas y posabsorción después de la finalización de una comida y se almacena en memorias asociativas para su uso futuro. Por otra parte, hay una cierta secuencia de comportamientos después de una comida saciante. Por ejemplo, se ha observado que cuando están naturalmente saciadas, las ratas dejan de comer, se acicalan y exploran por un corto tiempo, y luego descansan o duermen (Antin et al., 1975). Lo cual sugiere una extensa comunicación entre los sistemas neurológicos que controlan diferentes comportamientos (Berthoud, 2002).

## **1.2 INGESTA DE ALIMENTO Y PESO CORPORAL**

Aunque la alimentación es una necesidad básica del organismo para su supervivencia, ya que una cantidad determinada de energía es absolutamente necesaria para mantener el peso corporal constante, no hay necesidad de una regulación estricta de la ingesta de alimentos, porque al menos a corto plazo, la energía faltante puede provenir del almacenamiento y puede consumirse el exceso de energía (Blundell y King, 1998). Para el peso corporal constante a largo plazo, sin embargo, la ingesta de energía no puede estar por encima de un cierto umbral para un nivel dado de gasto (Berthoud, 2002).

La “teoría del punto de ajuste” fue posiblemente la teoría más influyente y debatida sobre el control del peso corporal y sugiere que, al igual que la temperatura en una habitación controlada por un termostato, el peso corporal está controlado por un dispositivo equivalente (adipostato) que reside en el hipotálamo y recibe información del parámetro controlado (peso corporal o grasa corporal),

generando una señal de error en un comparador si esta señal se desvía de un valor de referencia preestablecido, que se utiliza para subir o bajar los niveles del parámetro controlado (energía entrante o pérdida de energía en el caso de peso corporal/adiposidad). A pesar de que esta idea ha sido abandonada aún se cree en una señal que esencialmente rastrea el peso corporal. Las nuevas opiniones prevalecientes no reconocen ni un factor único u hormona, pero se basan en la existencia de una serie de factores para proporcionar no solo retroalimentación negativa sino también positiva que resultan en un equilibrio energético a largo plazo (Levine y Billington, 1997; Berthoud, 2002). Dichos mecanismos se encuentran regulados por lo que se conoce por el circuito hambre-saciedad del hipotálamo.

### **1.3 CIRCUITO HAMBRE-SACIEDAD**

El hambre, la saciedad y el balance energético, son regulados por un sistema neuroendócrino integrado a nivel del hipotálamo; el cual se conforma por una compleja red de circuitos neurohormonales y por factores de tipo sensorial, mecánico y cognoscitivo (González et al., 2006; Lizarbe y Cerdán, 2013).

Las áreas cerebrales clave asociadas con el balance energético fueron identificadas por primera vez utilizando estudios de lesión hipotalámica que alteraron la ingesta de alimentos; donde se demostró que cuando se dañan experimentalmente el núcleo ventromedial (NVM) y el núcleo paraventricular (NPV) se originan hiperfagia y obesidad, en tanto que el daño del área hipotalámica lateral (AHL) produce anorexia severa y pérdida de peso corporal. Así mismo, dichos estudios identificaron al AHL como “el centro del hambre”, mientras que el NVM fue determinado como “el centro de la saciedad” (Stellar, 1954). Si bien esta concepción de regulación dual de la ingesta por el LHA y el VMH ha sido descartada (o ha sido sustituida) demostró la complejidad de la regulación de esta función.

El circuito hambre-saciedad inicia con señales que tienen efectos orexigénicos (Tabla 1), es decir, que inducen el hambre (la necesidad de alimento) y el apetito (preferencia por algún alimento). Dichas señales promueven la ingesta alimentaria, actuando de 10-15 minutos previos al inicio de la alimentación aproximadamente y activan vías anabólicas que se encargan del mantenimiento del

peso corporal. Estas señales moleculares orexigénicas pueden ser de múltiples tipos; entre ellas se encuentran péptidos (grelina, neuropéptido Y, proteína agouti, galanina, orexinas A y B, beta endorfinas), monoaminas (noradrenalina sobre los receptores de alfa 2), hormonas (glucocorticoides, hormona concentradora de melanina) y endocannabinoides (anandamida, 2-araquidonol) (González et al., 2006).

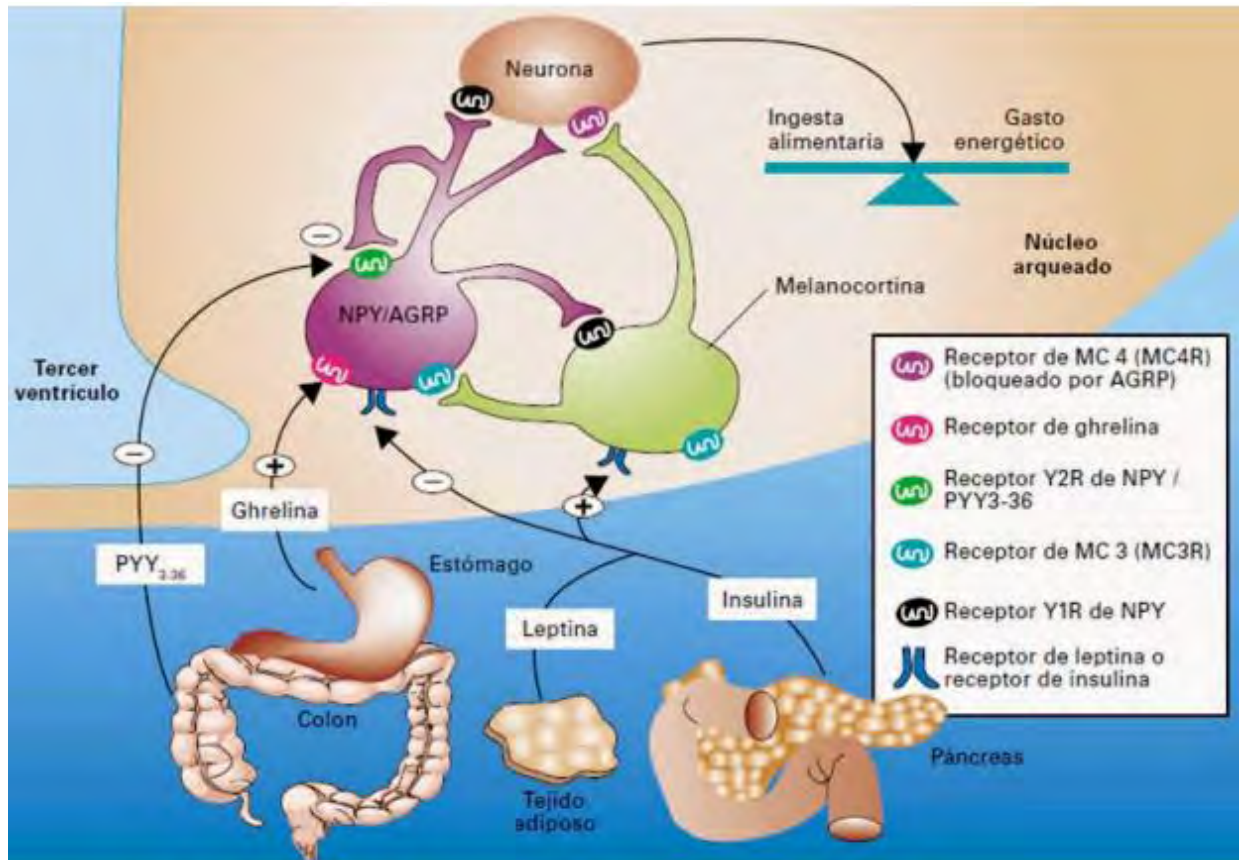
Por su parte, las señales de saciedad tras la ingesta de alimentos activan el sistema catabólico a través de mecanismos que aumentan el gasto energético y disminuyen el consumo alimenticio, teniendo así efectos anorexigénicos. Como las señales que inducen el hambre, las que inducen la saciedad pueden ser de múltiples orígenes; encontrando péptidos (colecistocinina, enterostatina, péptido similar al glucagón, somatostatina, amilina, péptido liberador de gastrina, péptido YY, péptido liberador de prolactina, neurotensina, sistema de melanocortinas, transcrito regulado por cocaína y anfetamina), hormonas (leptina, insulina, hormona liberadora de corticotropina, proteína estimuladora del alfa melanocito), citocinas (interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa), metabolitos (oleiletanolamida) y monoaminas (serotonina, noradrenalina en receptores de alfa 1 y beta 2, dopamina, histamina) (González et al., 2006).

<b>Tabla 1. Señales Moleculares que Modifican el Consumo de Alimentos</b>		
	<b>Orexigénicas</b>	<b>Anorexigénicas</b>
<b>Péptidos</b>	Grelina Neuropéptido Y Proteína Agouti Galanina Orexinas A y B Beta endorfinas	Colecistocinina, Enterostatina, Péptido Similar al Glucagón, Somatostatina, Amilina, Péptido Liberador de Gastrina, Péptido YY, Péptido Liberador de Prolactina, Neurotensina, Sistema de Melanocortinas, Transcrito Regulado por Cocaína y Anfetamina

<b>Monoaminas</b>	Noradrenalina (Receptores de $\alpha 2$ )	Serotonina, Noradrenalina (Receptores de $\alpha 1$ y $\beta 2$ ), Dopamina, Histamina
<b>Hormonas</b>	Glucocorticoides Hormona Concentradora de Melanina	Leptina, Insulina, Hormona Liberadora de Corticotropina, Proteína Estimuladora del $\alpha$ melanocito
<b>Otras</b>	Endocannabinoides (Anandamida, 2-Araquidonoil)	Citocinas (Interleucina 6, Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ ) Metabolitos (oleiletanolamida)

Así pues, el balance energético se mantiene por mecanismos que controlan tanto el consumo como el gasto energético (Fig. 2). Por ejemplo, la distensión intestinal provoca la liberación de péptidos gástricos como la colecistoquinina (CCK) y la grelina, que a través de conexiones aferentes al nervio vago son capaces de informar al cerebro sobre la disponibilidad de nutrientes que tiene el organismo. Mientras que la CCK provoca la inhibición de la conducta alimentaria cuando el individuo se encuentra saciado, la grelina sintetizada por las glándulas oxínticas del estómago, por el contrario induce la búsqueda de alimentos (Chaudhri et al., 2006) Por su parte, los adipocitos y el páncreas liberan las hormonas leptina e insulina respectivamente, que viajan a través de la circulación e informan al cerebro sobre el estado del balance energético del organismo. La insulina por su parte, fue la primera señal hormonal que se relacionó con el control del peso corporal por el sistema nervioso central (SNC), donde actúa para reducir la ingesta energética (Woods et al., 1979); informando al cerebro de la condición de las reservas energéticas y la disponibilidad de los nutrientes a través de sus receptores en el NARC. En tanto, la leptina tiene acción anorexigénica y es producida en proporción al tamaño y volumen de los adipocitos, actuando sobre receptores localizados en el NTS, el NARC y el NPV del hipotálamo (Schwartz et al., 2000). Sin embargo, a pesar del estricto control que tiene la conducta alimentaria a través de la variedad de señales involucradas, es evidente que existen condiciones que ponen en riesgo la homeostasia energética e inducen a conductas aberrantes como la anorexia, lo cual demanda el estudio de su neurobiología

(De Gortari, 2009).



**Fig. 2. Control Hipotalámico del Balance Energético (Lizarbe y Cerdán, 2013).** El apetito está regulado por un mecanismo complejo integrado a nivel del hipotálamo, que controla tanto el consumo como el gasto energético. Este mecanismo involucra señales endocrinas orexigénicas y anorexigénicas. Por ejemplo, la distensión intestinal provoca la liberación de péptidos gástricos como la leptina y la grelina, que a través de conexiones aferentes son capaces de informar al cerebro sobre la disponibilidad que tiene el organismo de nutrientes. Mientras que la leptina provoca la inhibición de la conducta alimentaria cuando el individuo se encuentra saciado, la grelina por el contrario induce la búsqueda de alimentos.

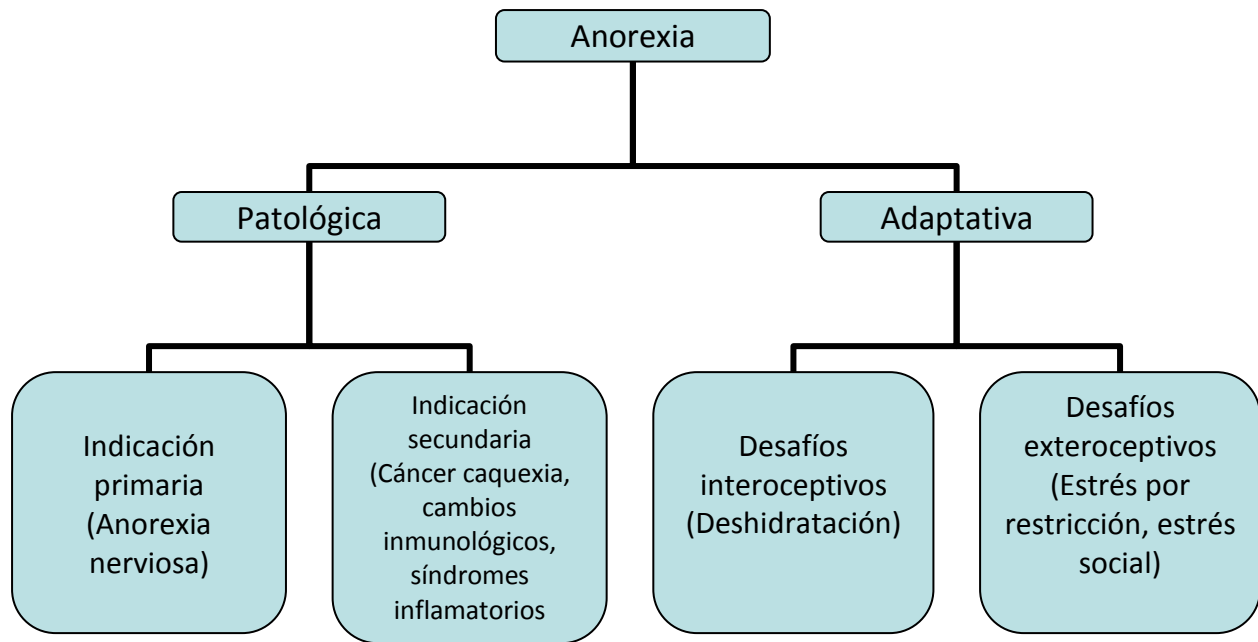
## 1.4 ANOREXIA

El término “anorexia” describe cualquier pérdida de apetito y desmotivación por el consumo de alimentos, a pesar de que éstos se encuentren disponibles, acompañado de una significativa pérdida de peso corporal. Puede ocurrir en dos tipos de condiciones (Fig.3): en el primer caso, es un síntoma que acompaña a diversas patologías, que pueden ser subdivididas en dos grupos; (1) la anorexia



con origen psicológico, que se denomina anorexia nerviosa (AN) y tiene importancia clínica creciente; (2) la anorexia asociada con estados patológicos, como el cáncer, el SIDA u otros, donde el gasto excesivo de grasa y proteínas corporales lleva a la caquexia (que se define como un trastorno metabólico, caracterizado por la aparición de una disminución del apetito, pérdida de peso y atrofia de la masa muscular del organismo, que a pesar de un correcto aporte calórico y nutricional no se logra revertir) (Sanz et al., 2004). En el segundo caso, la anorexia puede ser una respuesta conductual de adaptación a retos homeostáticos; que pueden originarse externamente, como sucede con la anorexia que acompaña al estrés o que pueden ser complemento a un desafío fisiológico como estados febriles o como la deshidratación celular que se produce después de la ingestión de solución salina hipertónica (De Gortari, 2009; Watts y Salter, 2007).

Además, la reducción de la ingesta en presencia de alimentos o la falta de su búsqueda ha sido documentada en varias especies animales durante temporadas de hibernación, incubación, muda o defensa del territorio, donde la alimentación compite con otras actividades de mayor importancia, lo cual se considera otro tipo de anorexia adaptativa. Por ejemplo, los pingüinos emperadores (*Aptenodytes forsteri*) que se reproducen durante el invierno austral desarrollan este tipo de anorexia, ya que los machos asumen el rol de cuidado e incubación del huevo por periodos de 62-64 días hasta que el huevo eclosiona, mientras que las hembras van al océano en búsqueda de alimento, de forma que los machos no se alimentan por largos periodos de tiempo de hasta 120 días en espera del regreso de las hembras, llegando a perder alrededor del 40% de su peso corporal (Mrosovsky y Sherry, 1980).



**Fig. 3. Anorexia (Adaptado de Watts y Salter, 2004).** En una primera aproximación, la anorexia puede ser dividida en dos grupos: uno que está asociado a condiciones patológicas y otro asociado a respuestas adaptativas ante retos metabólicos.

Sin embargo, de los tipos de anorexia mencionados, la AN ha adquirido gran importancia clínica debido a que los individuos con trastornos de alimentación tienen tasas de mortalidad significativamente elevadas, siendo las tasas más altas en aquellos que padecen AN (Arcelus et al., 2011). El término “anorexia nerviosa” fue acuñado en 1873 por Sir William Gull, uno de los médicos personales de la Reina Victoria y proviene del griego an- (prefijo que denota negación) y orexis (apetito), que en conjunto significa “sin apetito” (Gull, 1997).

Conforme a los criterios del DSM-5, la AN se define como un trastorno psiquiátrico que se caracteriza por una autopercepción distorsionada de la imagen corporal y temor a subir de peso, lo que conlleva a un régimen alimenticio restringido que resulta en una disminución significativa del peso corporal del individuo (Fig.4; APA, 2014). Se estima que su prevalencia en la población mundial es de 1.7%, con mayor incidencia entre las mujeres (Smink et al., 2014). En México, el Instituto Nacional de Psiquiatría registró que 9 de cada 10 casos de AN corresponden a mujeres y la edad en la que la mayoría de la población presenta esta enfermedad es entre los 12 y 17 años (INPRF, 2010). Aunque la AN ha sido vista como un trastorno influenciado principalmente por factores socioculturales, algunos estudios han demostrado la contribución de factores genéticos

para su desarrollo (Bulik et al., 2007), por ejemplo, se ha asociado con ciertos genes como variantes intrónicas de SOX2OT y PPP3CA, señales adicionales ubicadas entre CUL3 y FAM124B, y cuatro genes que regulan la sinaptogénesis en el cerebro: SYN2, NCAM2, CNTNAP2 y CTNNA2 (Boraska et al., 2014). Hasta la fecha no existen tratamientos farmacológicos aceptados para la AN, lo que refleja la escasez de conocimientos sobre su neurobiología. En particular, los ansiolíticos, tales como las benzodiazepinas, no son eficaces para tratarla o para prevenir su recaída, a pesar de que la ansiedad es altamente comórbida con la AN (Aoki et al., 2016). La recaída, el atracón o el hambre después del aumento de peso inicial tras los tratamientos comúnmente empleados ocurren en el 40-70% de los pacientes (Cooper, 2005).

<b>Clasificación de los Desórdenes Alimenticios (DSM-5)</b>
<input type="checkbox"/> Anorexia Nerviosa
<input type="checkbox"/> Bulimia Nerviosa
<input type="checkbox"/> Trastorno de Atracón
<input type="checkbox"/> Otro Trastorno Alimentario Especificado/No Especificado

<b>Criterios Diagnósticos para la Anorexia Nerviosa (DSM-5)</b>
<input type="checkbox"/> <b>Restricción de la Ingesta de Alimentos</b> Comer menos de lo necesario para mantener un peso corporal que sea igual o superior al peso normal mínimo para la edad y la altura.
<input type="checkbox"/> <b>Miedo a Ganar Peso</b> Miedo intenso al aumento de peso o comportamientos persistentes que interfieren con el aumento de peso (vómitos, uso de laxantes, incluso con bajo peso).
<input type="checkbox"/> <b>Problemas de Imagen Corporal</b> Negar la gravedad de tener un peso corporal bajo, relacionar el peso con la autoestima o tener una imagen corporal distorsionada en apariencia o forma.

**Fig. 4. Anorexia Nerviosa (Adaptado de Yoshimura, 2015).** Se muestra la clasificación de trastornos alimenticios y criterios diagnósticos para la AN según el DSM-5.

## 1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE ANOREXIA

El desarrollo de un modelo animal apropiado para estudiar la AN es difícil, ya que la etiología de este trastorno alimenticio involucra una interacción compleja entre factores genéticos, ambientales, sociales y culturales, que no tienen paralelo en animales. Sin embargo, características como el sexo femenino, la pubertad, la disminución de la ingesta de alimentos asociados con una pérdida significativa de peso y adaptaciones neuro-endócrinas han resultado fundamentales para modelar

la AN en animales y podrían ayudar a comprender los mecanismos neurobiológicos implicados en esta enfermedad (Siegfried et al., 2003).

Uno de los modelos más sencillos y accesibles para su implementación es el modelo de anorexia inducida por deshidratación (AID), en el cual se han reportado algunos de los mecanismos neuronales y moleculares que permiten que los animales adapten su conducta alimentaria para hacer frente a las presiones impuestas por su entorno, en este caso la deshidratación (Watts, 1998; Yoshimura et al., 2014). Este modelo murino genera una conducta de anorexia a partir de un desequilibrio electrolítico y posee la ventaja de que la disminución de la ingesta de alimentos es “voluntaria”, ya que los animales reducen su ingesta a pesar de la presencia de alimento. En este modelo se desarrolla una anorexia adaptativa y no patológica como la AN (Fig.1). Sin embargo, algunos estudios han señalado que la AID tiene en común con la AN: alteraciones en los niveles de señales químicas implicadas con la conducta alimentaria; como lo es el aumento de la expresión de la hormona liberadora de tirotrina (TRH), que se ha relacionado con la desmotivación para consumir alimento (Jaimes et al., 2008).

Otro modelo en roedores que es ampliamente utilizado es el de anorexia basada en la actividad (ABA), en donde los animales presentan restricción alimenticia severa, alteraciones en el ciclo del estrógeno, producción alterada de hormonas, pérdida de peso e hiperactividad; sin embargo, la decisión de restringir la ingesta de alimentos es forzada (Belmonte et al., 2016; Casper et al., 2008; Lee y Kinzig, 2017; Paré, 1977; Paulukat et al., 2016; Watanabe et al., 1992). En 1953, Hall et al. demostraron que las ratas eran, paradójicamente, hiperactivas cuando el acceso a los alimentos estaba restringido, a pesar de fomentar su inanición al aumentar el consumo de energía por actividad (Hall et al., 1953). Más tarde este modelo fue desarrollado por Routtenberg y Kuznesof en 1967, utilizando un horario de alimentación restringido y acceso a ruedas para correr (Routtenberg y Kuznesof, 1967). La hiperactividad en el desarrollo de ABA puede explicarse inicialmente por un comportamiento de búsqueda de alimentos. Además, esta mayor actividad parece deberse en parte a la falta de leptina, ya que se ha demostrado que la hiperactividad disminuye significativamente cuando a las ratas se les administra leptina (Exner et al., 2000; Frintrop et al., 2017). En la AN se presenta hiperactividad, hay estudios en pacientes internadas que se les siguió su actividad con un contador de pasos y se encontró que las anoréxicas subían y

bajaban las escaleras y hacían mucha más actividad que pacientes no anoréxicas (Achamrah et al., 2016).

El ratón anoréxico *anx/anx* es un modelo atractivo para el estudio de trastornos en el comportamiento alimentario (Maltais et al., 1984), ya que exhibe fenotipos asociados como fracaso para un buen desarrollo en etapas tempranas (Kasese-Hara et al., 2002), anorexia nerviosa (Kaye, 2008) y caquexia (Ramos et al., 2004). Este ratón surgió por una mutación espontánea (anorexia, alelo “*anx*”) y se caracteriza por poco apetito y contenido estomacal reducido; además, muere alrededor de tres semanas después del nacimiento, probablemente debido a la inanición severa. Los ratones *anx/anx* comen significativamente menos que sus compañeros de camada tipo salvaje, pesando al día posnatal 21 (P21) la mitad de éstos, lo que les da una apariencia demacrada; además, exhiben una serie de anomalías neurológicas como temblores corporales, movimientos de la cabeza, hiperactividad y marcha descoordinada (Maltais et al., 1984). Cabe señalar, que varios sistemas de neurotransmisores (Jahng et al., 1998; Johansen et al., 2001) y neuropéptidos (Broberger et al., 1997; Broberger et al., 1998; Broberger et al., 1999, Johansen et al., 2000; Nilsson et al., 2008) implicados en la regulación de la ingesta de alimentos y el metabolismo energético se han encontrado alterados en el ratón *anx/anx*, donde la mayoría de estos hallazgos se centran en el hipotálamo.

La anorexia inducida por cisplatino, es uno de los modelos animales fisiopatológicos de anorexia. El cisplatino es usado ampliamente en quimioterapia para tratar diferentes tipos de tumores malignos, ya que se ha demostrado que tiene efectos anti-tumorales al inhibir la replicación del ADN (Kocsis et al., 1973); sin embargo, presenta diversos efectos secundarios como pérdida de apetito, náuseas y vómitos (du Sert et al., 2011). Algunos estudios en este modelo han encontrado cambios en neuropéptidos inducidos por el cisplatino, donde hay una regulación a la alza de neuropéptidos anorexigénicos y a la baja de los orexigénicos en el hipotálamo. Por ejemplo, Yakabi et al., demostraron que la secreción del neuropéptido grelina en el hipotálamo se reduce notablemente a las 24 y 48 hrs después del tratamiento con cisplatino en ratas y que la administración intracerebroventricular de grelina revierte la disminución en la ingesta de alimentos (Yakabi et al., 2010).

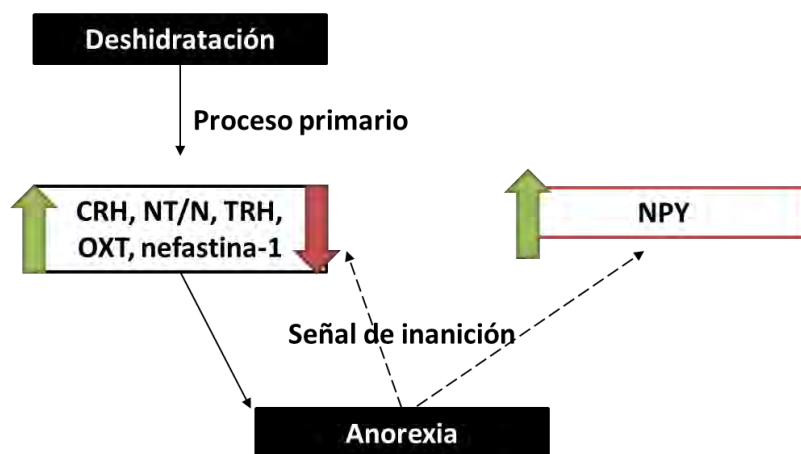
## 1.6 ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN

La anorexia inducida por deshidratación es un modelo en el cual se presentan mecanismos de adaptación para proteger los compartimientos celulares de la hipernatremia y la hiperosmolemia inducida por la ingestión de una solución salina hipertónica (NaCl 2.5%). En estas circunstancias, se produce una marcada supresión de la ingesta de alimentos que tiene dos propósitos: 1) Reducir la cantidad de agua requerida para la digestión, lo que permite disminuir los efectos de la hiperosmolemia. 2) Reducir la ingesta de osmolitos incorporados a través de los alimentos. Así pues, este modelo implica una adaptación fisiológica importante que limita la ingesta de osmolitos y ayuda a mantener la integridad de los compartimientos de líquidos (Boyle, 2012).

Hay varias formas en que la privación de agua puede inhibir la ingesta de alimentos. En primer lugar, al menos en la rata, beber normalmente está estrechamente relacionado con la comida, por lo que interferir con el patrón normal de ingesta de agua con las comidas puede inhibir la ingesta de alimentos (Fitzsimons y LeMagen, 1969; Kissileff, 1969). En segundo lugar, la privación de agua causa sequedad en la boca (Winsor, 1930; Schoorlemmer, 2002), lo que podría dificultar la alimentación (Vance, 1965), especialmente cuando el período de privación de agua es prolongado y la comida está seca. En tercer lugar, pueden verse afectados los osmorreceptores u otros detectores del estado de los fluidos corporales en el cerebro, la circulación o el intestino. En la rata, varios estímulos conocidos por causar sed y antidiuresis también inhiben la alimentación, incluyendo la inyección de soluciones hipertónicas en el tracto gastrointestinal o en la cavidad peritoneal, la inyección de coloide hiperoncótico bajo la piel y la inyección de angiotensina en el cerebro (Gutman y Kraus, 1968; Huang et al., 2000; Kraly et al., 1998; Rolls y McFarland, 1973; Yin y Tsai, 1973). Por otra parte, algunas investigaciones en vacas sugiere que la hipertonidad del contenido ruminal media la reducción en la ingesta de alimentos durante la privación de agua en los rumiantes (Senn et al., 1996; Steiger et al., 2000).

El modelo de anorexia inducida por deshidratación admite la existencia de interacciones complejas y variadas de redes neuronales que proporcionan a los animales la capacidad de adaptar su conducta alimentaria para hacer frente a las diversas presiones impuestas por el medio ambiente (Watts y Boyle, 2010). Algunos estudios plantean la hipótesis de que la deshidratación principalmente causa

la regulación a la alza de la expresión génica de neuropéptidos anorexigénicos en el hipotálamo, a partir de lo cual se promueve después la inanición inducida por la anorexia, es decir, el balance energético negativo, que posteriormente regula a la alza la expresión génica de neuropéptidos orexigénicos (Fig.3; Watts et al, 1999; Watts, 2001; Schoorlemmer, 2002). Aunque la razón por la cual la deshidratación provoca principalmente la regulación positiva de neuropéptidos anorexigénicos pero no a la baja de los orexigénicos permanece sin estar clara; sin embargo, se ha propuesto una posible participación de factores humorales periféricos como leptina y grelina circulantes, oxitocina (OXT) y nefastina-1 (Yoshimura et al, 2014). Rinaman et al. (2005), demostraron que la anorexia inducida por deshidratación se atenúa en ratones deficientes en OXT, además de una menor activación de neuronas dentro del complejo vagal dorsal del cerebro posterior en ratones deshidratados *knockout* para OXT en comparación con los ratones de tipo salvaje deshidratados; lo que sugiere que las proyecciones neuronales de OXT desde el hipotálamo hasta el cerebro posterior son necesarias para la expresión completa de las respuestas comportamentales y fisiológicas compensatorias a la deshidratación (Rinaman, 2005).



**Fig. 3. Anorexia Inducida por Deshidratación (Adaptado de Yoshimura, 2015).** La deshidratación provoca la regulación de péptidos hipotalámicos anorexigénicos a la alza que conllevan a la inanición por anorexia, tras lo cual se regulan a la alza los péptidos hipotalámicos orexigénicos.

Una de las ventajas de este modelo, es que la alimentación se restablece rápidamente una vez que el agua potable se pone a disposición del animal (Watts, 1998). Cabe mencionar que, la relativa sencillez y reproducibilidad de este modelo lo convierten en una aproximación experimental de gran utilidad para la investigación de los mecanismos a través de los cuales las células nerviosas

regulan la ingesta de alimento (Watts y Boyle, 2010).

### **1.7 ALTERACIONES DEL CIRCUITO HAMBRE-SACIEDAD EN ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN**

En el modelo AID se ha demostrado que existen cambios en la expresión de genes de algunos neuropéptidos y hormonas en el hipotálamo asociados al comportamiento alimentario. En el NARC, por ejemplo, aumenta significativamente la expresión del neuropéptido Y (NPY) en los animales deshidratados en comparación de los que no lo están. Lo anterior se acompaña de una disminución significativa en la expresión de los genes de la proopiomelanocortina (POMC) y neurotensina/neuromedina N (NT/N) en el NARC y del gen de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el NPV (Watts et al., 1995).

Además, algunos estudios han reportado que la expresión de CRH en el AHL está fuertemente correlacionada con la intensidad de la anorexia y tales resultados han sugerido que la expresión de los genes de CRH y NT/N en el AHL que aumentan en el modelo AID actúan sobre el NPV, de manera que se suprime la alimentación en las ratas deshidratadas (Watts et al., 1999). Siendo que en el NPV se ven reforzadas las señales de saciedad, mientras que en el AHL (centro del hambre) se ven aumentadas las señales anorexigénicas, se obtiene como resultado un balance energético negativo que hace que los animales desarrollen anorexia por deshidratación (Watts, 2001; Yoshimura et al., 2014).

Aunque es evidente que en el modelo AID se ven comprometidos los mecanismos de hambre-saciedad del hipotálamo para el desarrollo de la anorexia en los animales, algunos estudios han reportado alteraciones en otras estructuras cerebrales. Trabajos previos de nuestro laboratorio reportaron alteraciones en la densidad de células gliales en el cuerpo calloso y el hipocampo, regiones del cerebro que no se había reportado que estuviesen directamente ligadas con los mecanismos de hambre-saciedad (Reyes-Haro et al., 2015; Reyes-Haro et al., 2016).



## 1.8 ANOREXIA E HIPOCAMPO

Estudios de resonancia magnética realizados en pacientes con AN reportaron que hay una reducción en el volumen total del hipocampo con respecto a mujeres sanas, lo que sugiere que esta región del cerebro podría estar implicada en la neurobiología de esta enfermedad (Giordano et al., 2001). Adicionalmente, el hipocampo ventral es una estructura que se conoce por su importancia en la respuesta emocional, donde se ha vinculado con la ansiedad y se ha encontrado que presenta alteraciones en modelos murinos de anorexia, donde los animales con anorexia presentan cambios en el contenido de oxígeno del tejido cerebral con respecto a los animales control (McHugh et al., 2011). Así, se ha propuesto un rol importante del hipocampo en la AN, ya que se conoce que la ansiedad es altamente comórbida con esta condición (Aoki et al., 2016).

Aunque el hipocampo no regula directamente el circuito hambre-saciedad y se le asocia con funciones de memoria, se cree que el inicio de la alimentación implica la interacción de dicha estructura con otras regiones cerebrales como la corteza y la amígdala para generar la representación de los alimentos (disponible como memoria), de manera que los asocia con estados de ánimo positivos derivados de la experiencia sensorial, lo cual motiva el consumo del alimento que concluye al ser ingerido (Verhagen, 2007). Además, se conoce que el hipocampo tiene conectividad con el hipotálamo (centro regulador de la ingesta de alimento) a través de proyecciones del hipocampo ventral (Cenquizca y Swanson, 2007; Tannenholz et al., 2014). Y, algunos estudios han reportado conexiones hipotalámicas con CA2 del área dorsal del hipocampo del ratón (Zhenzhong et al., 2013). Por otra parte, estudios recientes reportaron nuevos circuitos neuroquímicos que regulan el apetito a través de la señalización de la grelina con neuronas del hipocampo (Hsu et al., 2015).

Se cree que el hipocampo está involucrado de manera crucial en la memoria episódica (semántica) explícita y posiblemente en otras formas de aprendizaje, como el condicionamiento. Como tal, la formación del hipocampo probablemente se involucra con aspectos del aprendizaje y memoria de las conductas relacionadas con los alimentos, de manera semejante a lo que ocurre con otros comportamientos. Sin embargo, observaciones recientes en ratas sugieren un papel específico adicional de la alimentación para esta estructura límbica. Las ratas con lesiones neurotóxicas específicas del cuerpo celular en el hipocampo mostraron comidas y bebidas más pequeñas pero más frecuentes y una secuencia de saciedad normal, lo que sugiere una posible agnosia

interoceptiva. Además, el hipocampo exhibe altas concentraciones de receptores tipo 1 (mineralocorticoides) y tipo 2 (glucocorticoides). De manera importante, para el control de la ingesta de alimentos, recibe aferencias de las estructuras limboencefálicas relevantes tales como el hipotálamo lateral, la amígdala, la corteza olfativa y del sabor y la corteza prefrontal medial. Las proyecciones hipocampales están dirigidas hacia la corteza olfativa, las áreas de asociación cortical, especialmente las cortezas prefrontales medial (orbitofrontal e infralímbica) e insular, al cuerpo estriado ventral, incluyendo el núcleo accumbens, el hipotálamo lateral y la amígdala y el núcleo de la cama de la estría terminalis (Berthoud, 2002).

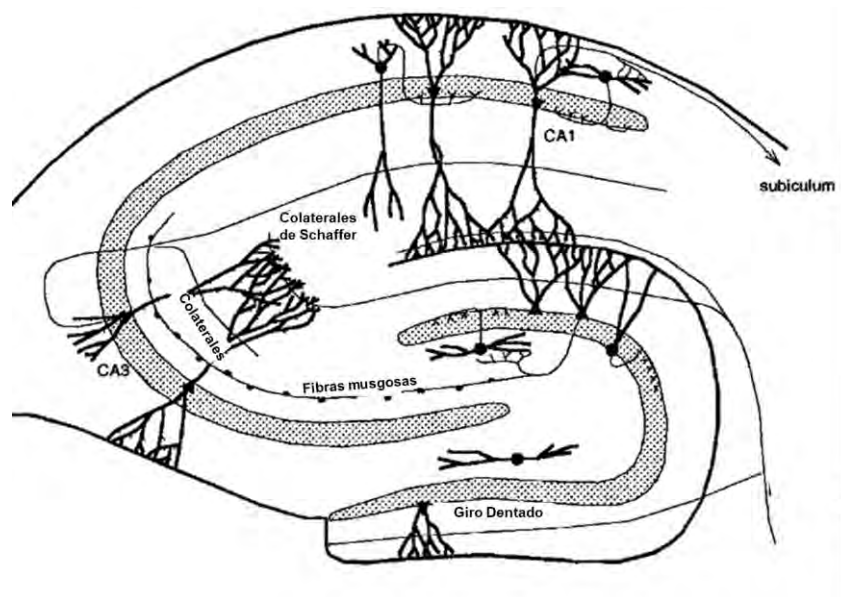
Estudios realizados en modelos murinos de anorexia como ABA mostraron una reducción en la proliferación celular en el hipocampo de ratas hembra (Barbarich et al., 2013) y recientemente, se reportó una disminución de la densidad de astrocitos en todas las regiones del hipocampo, excepto CA1, en el modelo AID (Reyes et al., 2016).

## 1.9 HIPOCAMPO

El hipocampo tiene tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1 (CA proveniente de *cornu ammonis*) y es parte de un sistema funcional del cerebro llamado formación hipocampal. Además, desde el punto de vista funcional, tal formación es considerada dentro del llamado sistema límbico, formado por varias estructuras cerebrales que gestionan respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales. La formación hipocampal es un grupo de áreas cerebrales que incluyen al giro dentado (GD), el hipocampo, el *subiculum*, el *presubiculum*, *parasubiculum* y la corteza entorrinal. El hipocampo es 100 veces más grande en humanos que en ratas; sin embargo, la arquitectura hipocampal básica es común en ambas especies (Andersen, et al., 2007).

La función de la formación hipocampal es controvertida y constituye un tema actual de investigación. Se piensa que participa en funciones relacionadas con la memoria y el aprendizaje y que la formación hipocampal podría participar activamente en mecanismos de orientación espacial que nos permiten reconocer e incluso predecir, por comparación con situaciones pasadas, acontecimientos de nuestro entorno (Jimenez, 2005).

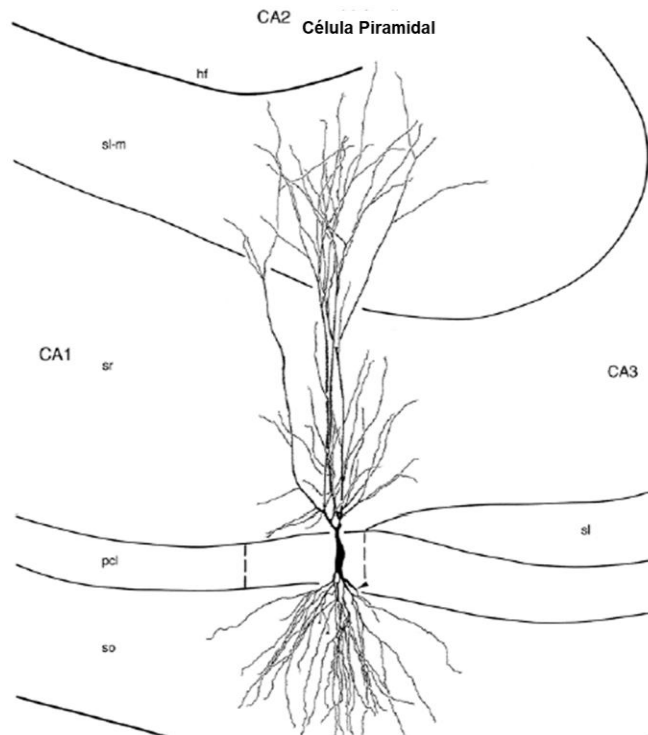
La anatomía básica del hipocampo ha inspirado para proponer cómo el SNC procesa la información mediante el flujo de información en serie y paralelo a través de diversas subestructuras (Fig.5). En general, la información entra al hipocampo desde la corteza entorrinal que proyecta a las células granulares del GD y a las células piramidales de las áreas CA3 y CA1. A su vez, CA3 tiene proyecciones dentro de CA3 mediante las fibras de asociación y comisurales, y hacia CA1 mediante las colaterales de Schaffer, así como también recibe sinapsis del GD mediante las fibras musgosas. La información sale del hipocampo desde CA1 mediante proyecciones a la corteza entorrinal y el subículo, así como mediante el fórnix hacia los cuerpos mamilares y el núcleo anterior del tálamo (Schultz y Rolls, 1999; Ketinó, 2013).



**Fig. 5. Anatomía Básica de la Formación Hipocampal (Schultz y Rolls, 1999).** La información entra al hipocampo desde la corteza entorrinal que proyecta al GD, CA3 y CA1, y sale del hipocampo desde CA1 mediante proyecciones a la corteza entorrinal y el subículo.

La organización celular del hipocampo está dividida en varios estratos (Fig.6), el primero consta de una capa celular principal llamada capa de células piramidales que abarca las regiones CA1, CA2 y CA3; estas células son las principales neuronas del hipocampo y es de los estratos más visibles al microscopio con la tinción apropiada. El estrato lúcido se encuentra justo por encima de la capa de células piramidales y es una zona acelular estrecha ocupada por fibras musgosas en CA3. El estrato *lacunosum*-molecular es la capa más superficial del hipocampo y se encuentran fibras de

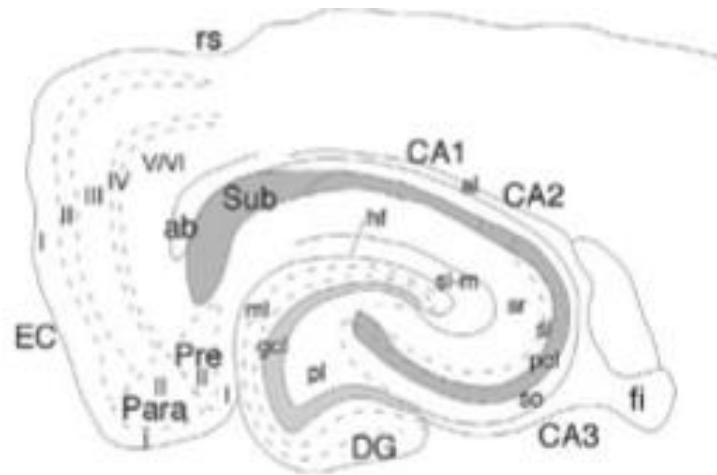
la corteza entorrinal e interneuronas. El estrato *oriens* es una capa relativamente libre de células que contiene dendritas de células piramidales y varios tipos de interneuronas. Finalmente, el estrato *radiatum* se encuentra en la superficie del estrato lúcido en CA3 y encima de las células piramidales en CA1 y CA2, en él se pueden encontrar fibras de Schaffer (axones de células piramidales) y algunas interneuronas.



**Fig. 6. Organización Celular del Hipocampo (Andersen et al., 2007).** La organización celular del hipocampo comprende varios estratos. El esquema representa los diferentes estratos en los que se divide el hipocampo, donde hf: fisura hipocampal, pcl: capa de células piramidales, sl: estrato lúcido, SL-m: estrato *lacunosum* molecular, so: estrato *oriens* y sr: estrato *radiatum*.

El GD por su parte, se compone de tres capas (Fig.7). Superficialmente, la más cercana a la fisura del hipocampo es una capa relativamente libre de células, llamada capa molecular. En rata, esta capa tiene un espesor medio de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ . La capa de células granulares se encuentra por debajo de la capa molecular y se compone de una capa densamente empaquetada que abarca de cuatro a ocho células granulares de espesor. Las células granulares y capa molecular forman una estructura de “V” que encierra una región celular, la capa de células polimórficas (hilio), que constituyen la tercera capa del giro GD (Andersen et al., 2007). El GD es una estructura

hipocampal de gran importancia, ya que se conoce que es un nicho neurogénico que adiciona nuevas células granulares al GD adulto, neuronas que se cree son de gran relevancia para la función del hipocampo (Cameron y McKay, 2001).



**Fig. 7. Organización Celular del GD (Andersen et al., 2007).** La organización celular del giro dentado se conforma por tres capas: ml (capa molecular), gcl (capa de células granulares) y pl (capa de células polimórficas o hilio).

Además de los tipos neuronales mencionados, la organización celular del hipocampo incluye a las células gliales. Se ha observado que un gran número de sinapsis del hipocampo son moduladas por los astrocitos (Araque y Perea, 2004; Henneberger et al., 2010; Volterra y Steinhäuser, 2004). Entre otras funciones, también se ha demostrado que la glía guía la migración neuronal en el hipocampo (Gasser y Hatten, 1990).

## 1.10 LA GLIA

La glía es el grupo celular más abundante del cerebro e históricamente se consideraba que sólo proporcionaba soporte a las neuronas. Sin embargo, actualmente se sabe que participan activamente en diversos aspectos de la función neuronal, incluyendo la regulación del metabolismo, neuroprotección, sinaptogénesis y neurotransmisión, entre muchas otras funciones. Con base en su morfología, fisiología y localización en el cerebro se pueden identificar diversos tipos de glía:

oligodendroglía, astrogía, glía NG2 y la microglía (Reyes-Haro et al., 2014).

La oligodendroglía (oligodendrocitos y células de Schwann) tiene un papel fundamental en la facilitación de la comunicación eléctrica, mediante la producción de mielina que hace más eficiente la comunicación neuronal (Reyes-Haro et al., 2014).

La astrogía comprende a los astrocitos, las células endociliales y la glía radial. Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC y se encuentran íntimamente asociados con las neuronas (Rouach y Giaume, 2001). Este tipo de células gliales ha sido implicado en funciones fisiológicas importantes como el control de la formación y función sináptica (sinapsis tripartita), la neurogénesis y la regulación del tono vascular del cerebro (Volterra y Meldolesi, 2005).

La glía NG2 constituye el 5-8% del total de células del SNC y es probablemente el tipo glial del que menor información se tiene. En general, se ha propuesto que este tipo glial abarca precursores de distintos tipos de células nerviosas, como oligodendrocitos, astrocitos y un tipo de glía radial exclusiva del cerebelo: la glía de Bergmann. A pesar de lo anterior, tanto este aspecto como el papel que juega la glía NG2 en la fisiología del cerebro ha resultado un tema controversial (Bergles et al., 2010; Reyes-Haro et al., 2014).

Las células microgliales, cuyo estudio fue de nuestro interés particular, forman parte del sistema inmune innato del SNC y su participación en estados patológicos ha sido ampliamente investigada (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011; Wolf et al., 2017). Actualmente, se cree que el número de células microgliales compone del 5% al 20% de toda la población glial del SNC. Se conoce que cualquier evento patológico en el cerebro conduce a la activación microglial. La microglía "en reposo" está presente en estados de homeostasis regulada y su función es monitorear constantemente la función sináptica y el entorno cerebral. Sin embargo, en condiciones patológicas, la microglía pasa de un estado de reposo a uno activo, cuya función es eliminar células dañadas y sinapsis disfuncionales, en un proceso denominado "poda sináptica". Además, tiene la capacidad de secretar moléculas pro-inflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) para favorecer la eliminación de células dañadas. Se ha demostrado a su vez que la disfunción microglial resulta en déficit de comportamiento, como lo es el autismo, lo que indica

que la microglia es esencial para la función cerebral adecuada (Kettenmann et al., 2013). Para este trabajo buscamos investigar si la AID produce efectos a nivel de este tipo de célula glial.

### **1.11 LA GLIA Y SU PAPEL EN LA INGESTA DE ALIMENTO**

Estudios recientes reportaron la participación de las células gliales en el control del apetito y la ingesta de alimentos, a través de la expresión de diversos receptores implicados en el circuito que regula la ingesta, como la insulina y la leptina, que informan al cerebro acerca de la disponibilidad de energía y se encargan de regular la ingesta de alimentos y el metabolismo de los lípidos, el cual tiene efectos tanto en la glía como en neuronas (García et al., 2012).

La leptina, por ejemplo, es una hormona secretada por el adipocito y se le conoce por su papel como factor de saciedad, siendo supresora del apetito. Se conoce que los astrocitos expresan diversas isoformas de su receptor (Pan et al., 2012). Aunado a ello, esta hormona se ha establecido como un componente importante en la respuesta inmune a patógenos a través de la inducción de la IL- $\beta$  y TNF- $\alpha$  cerebral, por lo que se ha demostrado que también la microglia posee receptores funcionales para ésta (Lafrance et al., 2010).

Por otra parte, se conoce que tanto la microglia como los astocitos pueden reaccionar en respuesta a señales metabólicas (García, et al., 2012). La activación de estos tipos gliales conduce a un proceso que se conoce como “gliosis”, que hace referencia al desarrollo de un fenotipo hipertrófico o reactivo (Kreutzberg, 1996, Freeman, 2010). Respecto a lo anterior, algunos estudios han vinculado a la microglia como promotor de la inflamación en el hipotálamo, siendo un mecanismo fisiopatológico que promueve el desarrollo de anorexia. Jin et al. (2016), mostraron que la activación del receptor tipo toll 2 (TLR2) por la inyección intracerebroventricular de su ligando, Pam3CSK4, desencadena inflamación a nivel hipotalámico y la activación de la microglia en el NARC, lo cual resulta en alteraciones de la organización de las aferencias sinápticas y una disminución de la actividad de neuronas de POMC, de manera que los animales tras dichos cambios desarrollan diferentes síntomas, entre los que se incluye la anorexia.

Este tipo de estudios han conducido a un campo completamente nuevo de investigación que explora

la importancia funcional de la activación glial, lo cual ha conducido a un debate centrado en investigar si la activación de las células gliales es un proceso beneficioso o perjudicial (Dávalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Estudios recientes basados en el modelo de AID, han reportado un incremento de la densidad de astrocitos reactivos en CA2 y GD del hipocampo (Reyes et al., 2016), lo cual creemos que podría implicar alteraciones en la microglia, siendo que es otro tipo celular con la capacidad de adquirir dicho fenotipo. Anteriormente, se creía que la microglia era una célula en estado de “reposo”; sin embargo, los avances que ha habido en torno a la investigación de este tipo de células gliales han demostrado que son células dinámicas que pueden experimentar transformaciones tanto morfológicas como funcionales al activarse.

## 1.12 INVESTIGACIÓN DE LA MICROGLIA

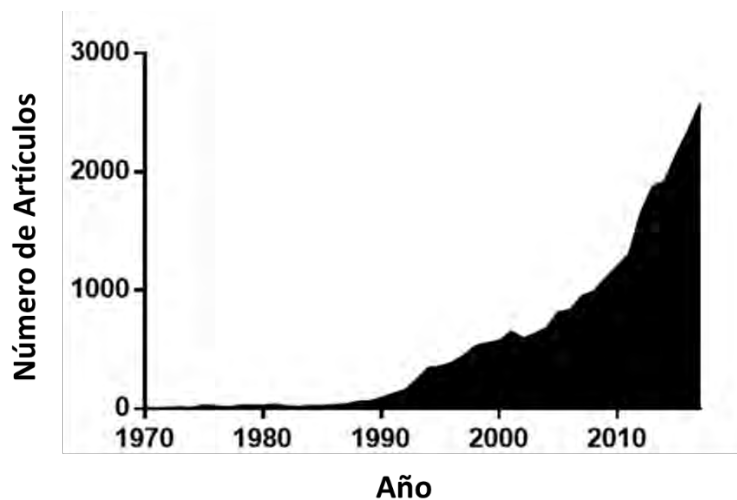
La investigación de la microglia surge a partir de que Santiago Ramón y Cajal con el método del sublimado de cloruro de oro distinguió algunas células poco teñidas, aparentemente apolares a las que llamó el "tercer elemento" (Cajal, 1913). Más tarde, Pio del Río Hortega desarrolló variantes de esta técnica, como el carbonato de plata amoniacal, lo cual le permitió un mejor estudio del tercer elemento de Cajal. Así, en 1932 separó el tercer elemento en dos tipos de células distintivas: microglia (mesoglia) y oligodendrocitos (glía interfascicular). Años más tarde, August Metz y Hugo Spatz confirmaron la naturaleza fagocítica de la microglia y las denominaron células de Hortega, debido a las aportaciones de dicho investigador (Hortegasche Zellen) (Iglesias-Rozas y Garrosa, 2013; Metz y Spatz, 1924).

Las investigaciones de Pio del Río-Hortega (1919) pueden considerarse como el comienzo de la era moderna de la investigación de la microglia. Primero, describió un protocolo para teñir específicamente la microglia y describió la morfología típica de este tipo de células en todas las regiones del cerebro normal. En otra publicación, mostró evidencia de que la microglia se transforma en células de barra (*rod cells*), células de limpieza (*clearing cells*) o cuerpos granuloadiposos (*granuloadipose bodies*), mismas que anteriormente habían sido observadas en diferentes tejidos patológicos por Franz Nissl y Alois Alzheimer (Alzheimer, 1910; Nissl, 1904). Más tarde, abordó el origen de la microglia presentando una serie de argumentos para apoyar el origen mesodérmico de este tipo celular. Este tema fue debatido durante muchos años y sólo



recientemente se demostró que se originan, de hecho, de precursores mesodérmicos de un linaje diferente (Ginhoux y Prinz, 2015). Finalmente, en otro conjunto de experimentos, del Río-Hortega produjo una herida de arma blanca en el cerebro de gatos recién nacidos y observó la migración y las transformaciones morfológicas de la microglia a lo largo del tiempo mediante estudios histopatológicos (Sierra et al., 2016).

La tremenda intuición de del Río-Hortega combinada con su enfoque sistemático y cuidadosas descripciones histológicas y dibujos lo llevaron a una serie de hipótesis funcionales que, a pesar de las técnicas limitadas disponibles en ese momento, siguen siendo válidas. Sin embargo, sorprendentemente el campo de la microglia no avanzó durante décadas y algunos neuropatólogos incluso negaron su existencia durante la mayor parte del siglo XX. No fue hasta finales de la década de 1960 cuando el grupo de George Kreutzberg comenzó a estudiar nuevamente este tipo de células utilizando una preparación del nervio facial lesionado (Blinzinger y Kreutzberg, 1968). Esto marcó el renacimiento de la investigación de la microglia (Figura 8).



**Fig. 8. Número de Artículos Publicados con la Palabra “Microglia”.** Búsqueda realizada en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=microglia> (fecha de búsqueda: 08/06/2018)

En la historia reciente, el debate sobre la ontogenia de la microglia ha sido sucedido por otra discusión ferviente, la cual está centrada en la importancia funcional de las células microgliales activadas. Históricamente, los investigadores suponían que la microglia se encontraba en un estado

de "reposo" hasta que estímulos patológicos desencadenaban su activación, experimentando transformaciones tanto morfológicas como funcionales. Sin embargo, algunos estudios demostraron que estas células nunca están en reposo. La idea de actividad en la microglia fue desarrollada tempranamente por Isaac Costero (1930-1931), quien documentó el comportamiento de la microglia en cultivo utilizando la cinemicrografía de lapso de tiempo, siendo el primero en investigar exhaustivamente la naturaleza dinámica de estas células en condiciones de cultivo celular (Fernández-Guardiola, 1997).

Además, hoy se conoce que las células gliales tienen propiedades eléctricas únicas que son diferentes a las propiedades neuronales. Los primeros estudios sobre propiedades microgliales electrofisiológicas se llevaron a cabo a principios de los años 90, informando que las corrientes de la membrana microglial son diferentes a las encontradas en los macrófagos periféricos. Las células microgliales tienen una alta resistencia de membrana, pocas corrientes dependientes de voltaje y potenciales de membrana altos de -20 a -40 mV (Boucsein et al., 2003). Se ha encontrado que la microglia cultivada *in vitro* tiene grandes corrientes rectificadoras de potasio (Kettenmann et al., 1990) y se ha identificado que estas corrientes están mediadas en gran medida por canales de potasio rectificadores internos ( $K_{ir}$ ) 2.1 (Lam y Schlichter, 2015), lo que influye en la proliferación microglial y la quimiotaxis. Un fenómeno característico en la microglía cultivada es el cambio en la actividad del canal iónico debido a la activación con LPS, un componente de la pared celular bacteriana gram-negativa. Después de la incubación con LPS, la actividad  $K_{ir}$  se reduce mientras se activa una fuerte corriente rectificadora retardada, la cual se ha encontrado que regula la liberación de citocinas (Charolidi et al., 2015) y la proliferación celular (Kotecha y Schlichter, 1999). Por otro lado, recientemente se descubrió que el canal de potasio THIK-1 de dos poros se expresa en células microgliales y es necesario para la motilidad del proceso microglial (Madry et al., 2018). Así pues, a pesar de que la microglia son células no excitables, estos estudios han demostrado que expresan una gran cantidad de canales iónicos, que están involucrados en varias funciones celulares durante la fisiología y la patología del cerebro.

En los últimos años, los estudios han demostrado que la microglia es altamente móvil en el cerebro sano y está examinando activamente el parénquima cerebral *in vivo* (Dávalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005); dichos estudios han combinado a la ingeniería genética (al utilizar

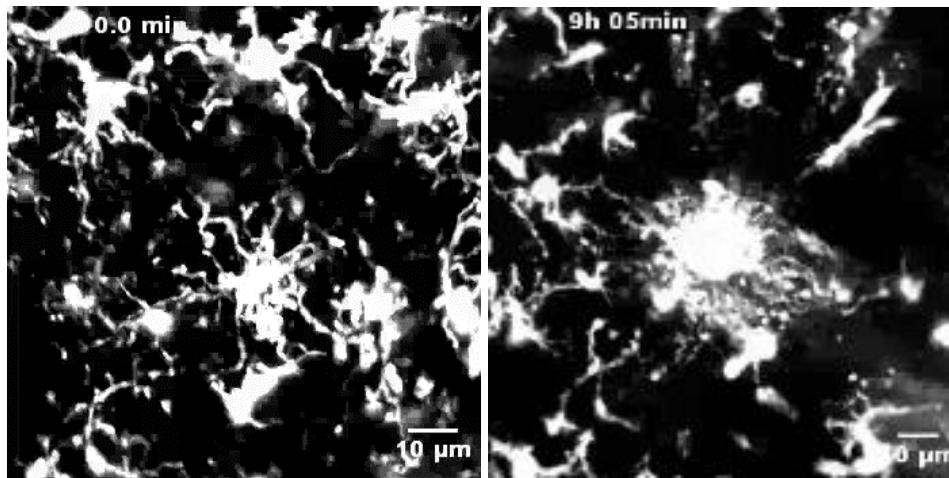
ratones transgénicos que expresan proteínas fluorescentes como e-GFP asociadas a la microglia) y a la microscopía de fluorescencia, lo cual ha permitido visualizar por primera vez a la microglia *in vivo* y 3D en su entorno intacto e inalterado, dentro de los 100-200  $\mu\text{m}$  superiores de la corteza cerebral del ratón (capas corticales 1, 2 y capa superior 3) a través de una ventana óptica (Nimmerjahn et al., 2005). Además, han permitido el estudio de las respuestas microgliales características a la lesión cerebral local *in vivo* (como quimiotaxis, transformación morfológica y fagocitosis), ello mediante daño inducido por láser a los microvasos cerebrales (Dávalos et al., 2005). A partir de dichos estudios, ha cambiado la idea de que las células microgliales descansan en condiciones fisiológicas y que sus funciones se limitan a condiciones patológicas, además de que se han descubierto nuevos roles fundamentales de estas células en el cerebro sano. Lo anterior ha llevado a explorar el papel de la microglia en la fisiología del cerebro y con ello ha surgido un campo nuevo de investigación que aborda si las células microgliales llevan a cabo procesos beneficiosos o perjudiciales (Dávalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005).

### **1.13 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA MICROGLIA**

Como se ha mencionado anteriormente, las funciones fisiológicas microgliales fueron subestimadas por un largo tiempo. Sin embargo, en las últimas décadas se han realizado hallazgos importantes que han demostrado que estas células son necesarias para el correcto desarrollo del cerebro y para mantener su funcionamiento durante una vida sana normal. Se pueden resumir cuatro funciones fisiológicas fundamentales de la microglia: 1) motilidad del proceso microglial, 2) quimiotaxis, 3) fagocitosis y 4) influencias funcionales sobre la actividad neuronal.

#### **1.13.1 MOTILIDAD DEL PROCESO MICROGLIAL**

Mientras que las células microgliales cultivadas tienen una forma bastante plana con pequeños procesos (Kettenmann et al., 1990), su morfología es mucho más compleja *in vivo*. En condiciones fisiológicas exhiben una morfología altamente ramificada con un pequeño componente somático y muchos procesos ramificados. Sin embargo, la microglia puede cambiar rápidamente su morfología a un estado más ameboide durante diferentes procesos de activación (Fig. 9). Además, tiene la capacidad de transformarse nuevamente en el estado ramificado de reposo (Walker et al., 2014).



**Fig. 9. Morfología típica de la microglia.** Se muestra la morfología típica de la microglia, en condiciones fisiológicas exhibe una morfología altamente ramificada (izquierda) aunque ésta puede cambiar rápidamente a un estado más ameboide durante diferentes procesos de activación (derecha). Adaptado de Davalos et al. (2005).

Como se mencionó anteriormente, la visión acerca del estado de "reposo" de la microglia cambió cuando se realizaron experimentos que incluían imágenes en lapso de tiempo *in vivo*, los cuales revelaron que la microglia y sus procesos no son estáticos sino altamente móviles, con una velocidad de crecimiento de alrededor de  $1 \mu\text{m} / \text{min}$  (Kettenmann et al., 2005). Se ha mostrado a su vez, que la microglia utiliza dichos procesos para explorar continuamente su entorno y hacer contacto frecuente con las sinapsis neuronales, de lo que puede depender la actividad neuronal (Wake et al., 2009). Este tipo de motilidad es necesario para la comunicación neuronal-microglía en el cerebro sano.

El canal de potasio THIK-1 de dos poros se expresa de manera dominante por la microglia en el cerebro y es el principal canal de iones que controla el potencial de membrana microglial. Se descubrió recientemente que la motilidad de la membrana depende del potencial de membrana y, por lo tanto, está controlada por THIK-1. Además, el bloqueo por THIK-1 con antagonistas específicos conduce a una reducción rápida de la motilidad, de manera que las células microgliales retraen sus procesos y se "congelan" (Madry et al., 2018).

### **1.13.2 QUIMIOTAXIS MICROGLIAL**

Además de la mencionada motilidad del proceso microglial, la microglia realiza un segundo tipo de motilidad en el proceso de quimiotaxis dirigida. Cuando se presenta una lesión como un daño tisular con un objeto filoso o una lesión láser focalizada, la microglia cambia rápidamente hacia un crecimiento directo del proceso hacia el insulto, tratando de sellar las células dañadas (Dávalos et al., 2005). Se conoce que este proceso depende de canales microgliales de cloruro y de la formación del citoesqueleto de actina (Hines et al., 2009).

El principal quimioatrayente de la microglia es el ATP (Dávalos et al., 2005), de manera que el ATP liberado es una molécula que actúa como señal para que la microglia actúe. La detección de ATP por células microgliales depende del receptor purinérgico metabotrópico P2Y12 (Haynes et al., 2006). Se conoce que el ATP activa diferentes corrientes de potasio, mediadas por el receptor P2X y P2Y en células microgliales (Boucsein et al., 2003) y se ha mostrado que la quimiotaxis mediada por el receptor P2Y12 desencadena corrientes externas de potasio (Wu et al., 2007). Además, se ha encontrado que el fibrinógeno actúa sobre el receptor 3 del complemento, actuando también como un proceso quimioatrayente (Dávalos et al., 2012).

### **1.13.3 FAGOCITOSIS MICROGLIAL**

Las células microgliales también son conocidas como “los fagocitos del cerebro”. La fagocitosis involucra procesos en los que el material es absorbido activamente por las células y con frecuencia se degrada dentro de éstas. Para las células microgliales diferenciamos entre dos tipos principales de fagocitosis: 1) reconocimiento y eliminación de patógenos o cascadas de señalización pro-inflamatorias y 2) eliminación controlada de células apoptóticas que inducen señalización anti-inflamatoria (Neumann et al., 2008).

Si bien las funciones fagocíticas de la microglía a menudo se desregulan en patologías, son de importancia fundamental durante el desarrollo del cerebro y durante la vida adulta. El ATP puede liberarse activamente por neuronas apoptóticas o liberarse de células dañadas y atraer a las células microgliales a través de la señalización del receptor P2Y12. Además, otra molécula se puede liberar

durante este proceso: UDP que se une al receptor P2Y6 en microglia (Inoue et al., 2009). Se ha demostrado que el UDP activa de manera efectiva la fagocitosis de la microglia como una señal de las neuronas lesionadas (Koizumi et al., 2007). Estos datos resaltan la importancia de la señalización purinérgica para las funciones microgliales.

Se conocen varias vías de señalización para la fagocitosis microglial y muchos receptores pueden estar involucrados. Otra función fagocítica recientemente descubierta de la microglia es la conformación de la red neuronal durante el desarrollo, mediante la fagocitosis de sinapsis no necesarias, proceso conocido como poda sináptica (Paolicelli et al., 2011).

#### **1.13.4 INFLUENCIAS FUNCIONALES SOBRE LA ACTIVIDAD NEURONAL**

Finalmente, además de las funciones mencionadas, se conoce que la microglia puede tener influencias funcionales sobre la actividad neuronal. Por ejemplo, tiene múltiples funciones durante el desarrollo del cerebro. La microglia es un tipo específico de glía con un origen mesodérmico, algo que las distingue entre las células nerviosas del cerebro. La microglia se origina durante la hematopoyesis de las células progenitoras mieloides primitivas del saco vitelino (Michell-Robinson et al., 2015). La hematopoyesis comienza alrededor del día 19 embrionario (E19) y se traslada transitoriamente al hígado fetal alrededor de las 4-5 semanas de gestación humana para finalmente establecerse en la médula ósea (Nimmerjahn et al., 2005). La microglia se puede identificar en el mesénquima extra cerebral desde la semana embrionaria 4.5 y continúan dispersándose en la materia cortical gris y blanca durante los primeros dos trimestres de la gestación humana.

La microglia tiene múltiples funciones durante el desarrollo del cerebro (Bilimoria y Stevens, 2015) entre ellas: 1) la regulación de la muerte neuronal (eliminación del exceso de neuronas durante el desarrollo), 2) poda sináptica (elimina el exceso de contactos sinápticos durante el desarrollo para lograr una conectividad sináptica adecuada) (Schafer y Stevens, 2010), 3) desarrollo neuronal y maduración de las sinapsis (se requiere microglia para la maduración de sinapsis). Además, el desarrollo neuronal está influenciado por la secreción microglial de citocinas, neurotrofinas y

factores de crecimiento (Paolicelli y Gross, 2011; Boche et al., 2013). Así pues, la función de microglia durante el desarrollo del cerebro es un elemento clave para la correcta maduración cerebral y las alteraciones en la fisiología microglial resultan en un trastorno del neurodesarrollo como el trastorno del espectro autista (Takano, 2015), trastorno obsesivo compulsivo (Frick y Pittenger, 2016), esquizofrenia (Inta et al., 2017) y parálisis cerebral (Mallard et al., 2014).

Además, bajo ciertas condiciones, la microglía puede activarse y agravar las condiciones neurodegenerativas en las que las neuronas defectuosas son la principal causa de la enfermedad. Por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer se caracterizan por agregados anormales de proteínas principalmente en las neuronas, lo cual puede provocar que la microglia se vuelva reactiva y eventualmente contribuya a un problema neuroinflamatorio crónico (Nayak et al., 2014).

Aunado a lo anterior, se conoce que la activación microglial puede estar relacionada con enfermedades como la anorexia (Tay et al., 2018). Por ejemplo, un estudio encontró bajo un modelo de anorexia con el ratón *anx*, un aumento en la densidad de microglia y TLR2, en el hipotálamo. Tras lo que el ratón presenta comportamientos alimentarios alterados, reduciendo significativamente la ingesta de alimentos hasta su muerte por inanición (3-5 semanas). La mutación *anx* se ha relacionado con alteraciones hipotalámicas que se sabe que tienen potentes funciones reguladoras en el control de la ingesta de alimentos (Nilsson et al., 2008).

#### **1.14 CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANOREXIA**

Aunque la obesidad está fuertemente asociada con la inflamación, en desórdenes alimenticios que involucran una pérdida de peso, como en la AN, se han hecho hallazgos de incrementos en los niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Solomi et al. (2015) sugieren que la IL-6 y la IL-1 $\beta$  están implicadas en el control del peso corporal por la regulación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos, además de que TNF- $\alpha$  media la producción de péptidos anorexigénicos (Inui, 2001). Por otra parte, Shimizu et al. (2005) reportaron que los niveles de TNF- $\alpha$  se encontraban elevados en pacientes con AN; un estudio adicional reportó niveles elevados de IL-6 en pacientes con AN (Misra et al.; 2006). Un hallazgo interesante fue realizado por

Ostrowska et al. (2015), donde en un subgrupo de niñas de 13-17 años encontraron aumentados los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , y han señalado una posible influencia de ello en marcadores óseos, postulando que las citocinas pro-inflamatorias elevadas podrían influir en el desarrollo de la osteoporosis en sujetos con AN. Por su parte, Nova et al. (2002), han examinado la producción *in vitro* de INF- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  en monocitos estimulados de sangre periférica obtenidos de 44 sujetos adolescentes con AN y demostraron que hay una reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6, y un aumento en IL-1 $\beta$  en el grupo de ingreso y un mes después del alta hospitalaria, sin encontrar diferencias en IL-2 y con una disminución de INF- $\gamma$  en pacientes con alta hospitalaria. Así pues, la evidencia disponible en los hallazgos mencionados sugiere que la AN está fuertemente asociada con la inflamación, evaluando a partir del contenido de citocinas pro-inflamatorias.

### 1.15 NEUROINFLAMACIÓN

La inflamación es una forma en la que actúa el Sistema Inmunológico (SI) como defensa del organismo, que tiene como objetivo aislar al agente responsable de la generación de daño en el mismo para su posterior eliminación (Roit et al., 1992). Desde una perspectiva histórica, el estudio de la inflamación se extiende más allá de dos mil años desde que los egipcios describieron abscesos y úlceras (que son algunas manifestaciones clínicas donde participa el proceso inflamatorio) o que aparecieron los primeros registros para tratar abscesos oculares en el Código Hammurabi (Barreno, 2008). Sin embargo, el estudio de la neuroinflamación que ocurre en el Sistema Nervioso Central (SNC), es de más reciente estudio y hoy en día incluso constituye un debate en torno a si es causa o consecuencia de la disfunción neural (Bilbo et al., 2012).

El término inflamación hace referencia a la respuesta del SI de un organismo (que constituye una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares) ante el daño causado a sus células y tejidos vascularizados por cualquier agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. En la periferia ocurre típicamente como una respuesta aguda a la lesión, rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente, que se desencadena por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales, y que produce cambios hemodinámicos que desencadenan los cuatro síntomas clásicos asociados a la inflamación: rubor (eritema), tumor (edema), calor y dolor (Lorenzo et al., 2000; Barreno, 2008). Mientras tanto, la neuroinflamación se asocia particularmente a la activación



glial crónica, por microglia y astrocitos, acompañada de la expresión exagerada de mediadores pro-inflamatorios dentro del SNC (como citocinas o especies reactivas de oxígeno) (Bilbo et al., 2012; Streit, 2010). La inflamación en el cerebro está caracterizada por la infiltración de células inmunes circulantes, como neutrófilos y monocitos, además de la activación de células residentes, como las células microgliales (quienes se consideran las células inmunes del SNC), los astrocitos y las células endoteliales, mismas que son capaces de expresar, liberar y responder ante mediadores inflamatorios, como citocinas, el complemento, proteínas de fase aguda y eicosanoides (Allan *et al.*, 2005).

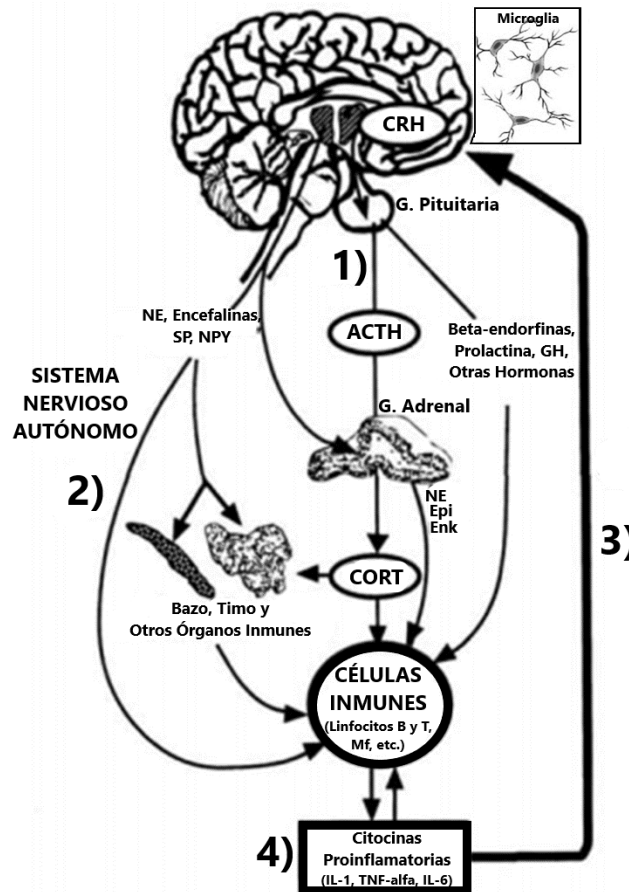
### **1.16 COMUNICACIÓN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL-SISTEMA INMUNE**

A pesar de que la neuroinflamación hace referencia a los procesos llevados a cabo dentro del SNC, es importante señalar que éste no es un sistema aislado y se encuentra en comunicación con el SI. Por lo que, más allá de su papel tradicional en la defensa del huésped y la reparación de tejidos, el SI ahora se considera un sistema difuso que funciona en conjunto con los sistemas endocrino y nervioso para mantener la homeostasis en todo el organismo (Husband, 1995; Vitkovic et al).

Las células inmunocompetentes se encuentran en todos los órganos, incluido el cerebro, donde se produce una comunicación regular entre el SNC y los tejidos inmunes periféricos durante los procesos de salud y enfermedad, a través de varias vías: 1) las hormonas del Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) (p. ej., glucocorticoides), para el cual las células inmunes tienen receptores, 2) el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) que inerva los tejidos linfoides (p. ej., nervio vago), 3) células inmunes periféricas circulantes (p. ej., células T CD4+) que pueden interactuar con las células inmunitarias residentes (como la microglia) y 4) a través de la liberación de citocinas y quimiocinas por las células inmunes tanto periféricas como del SNC, así como de otros tejidos "no inmunes" (como el del hígado o el tejido adiposo) que pueden tener funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas (Bilbo et al., 2012; Maier y Watkins, 1998) (Fig.9).

Además, es conocido que la comunicación bidireccional entre el SI y el SNC tiene un rol importante en los mecanismos de plasticidad sináptica y cognición del cerebro, no sólo mediando procesos de deterioro sino también contribuyendo a un funcionamiento normal y saludable. Por ejemplo, se ha

demostrado que la inyección de lipopolisacárido o LPS (el cual es el mayor componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas y es un activador del SI) a dosis altas periféricas en roedores interviene en los procesos de memoria y aprendizaje, donde actúa interfiriendo con la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo *in vivo* (Vereker et al., 2000); de manera que la comunicación SI-SNC está mediando un proceso de deterioro. En contraparte, se ha evidenciado que células T CD4+ (células inmunitarias de la periferia) especializadas en el reconocimiento específico de auto-antígenos del SNC son importantes para que se lleven a cabo mecanismos saludables de plasticidad, incluyendo la neurogénesis y procesos de aprendizaje y memoria, mediante interacciones con células mieloides meníngeas y microglia, y a través de la producción de IL-4 (Derecki et al., 2010; Ziv et al, 2006).



**Fig. 10. Comunicación Sistema Inmunológico-Sistema Nervioso Central (Adaptado de Maier y Watkins, 1998).** La comunicación SI-SNC se lleva a cabo por diferentes vías (1-4). CRH= hormona liberadora de corticotropina, ACTH= hormona adrenocorticotropa, CORT= corticosterona, NE= norepinefrina, Epi= epinefrina, Enk= encefalina, SP= sustancia P, NPY= neuropéptido Y, GH= hormona del crecimiento, Mf= macrófagos.

Así pues, el SI es un regulador de la función neural y cognitiva, ya sea a través de la mediación de citocinas implicadas en mecanismos de plasticidad sináptica importantes para la cognición (como la IL-4 en el ejemplo anterior), por medio de la influencia de factores inmunes en la neurogénesis (como las células T CD4+) o mediante la participación de células gliales (como la microglia).

### **1.16.1 INFLUENCIA DE LAS CITOCINAS EN EL SNC**

Se ha demostrado que las citocinas influyen en la cognición, entendiendo a ésta como un término que hace referencia al conjunto de procesos cognitivos de orden superior, como la atención, funciones ejecutivas, aprendizaje y memoria, conciencia y lenguaje, donde participan múltiples áreas del SNC (McAfoose y Baune, 2009). La evidencia actual muestra que principalmente la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), juegan un papel importante a nivel molecular y celular en los mecanismos que intervienen en procesos cognitivos superiores como aprendizaje y memoria bajo condiciones fisiológicas, lo cual proporciona una mayor comprensión de las funciones cerebrales normales y los mecanismos biológicos específicos que pudieran estar involucrados en condiciones de enfermedad (Bilbo *et al.*, 2012; McAfoose y Baune, 2009).

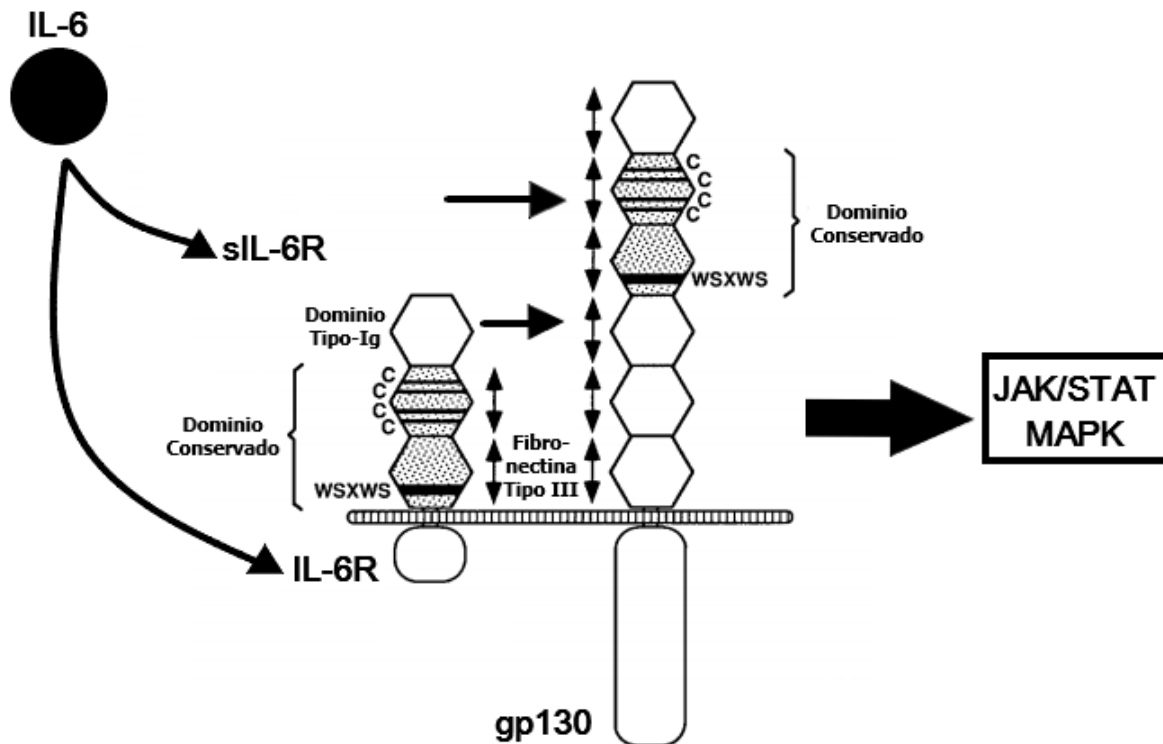
#### **1.16.1.1 IL-6**

La IL-6 es otro mediador de respuestas inflamatorias e inmunológicas y pertenece a una familia de factores neuropoiéticos (que intervienen en la diferenciación de células madre neurales a sus formas maduras) que incluyen al factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M (OSM), la IL-11, entre otros (Taga y Kishimoto, 1997).

En el SNC, la IL-6 es sintetizada principalmente por los astrocitos y, en menor medida por microglia y neuronas. Al igual que la IL-1 ejerce múltiples funciones fisiológicas dentro del SNC, que pueden resultar tanto neuroprotectoras como neurodegenerativas (McAfoose y Baune, 2009), mediante la formación de un complejo hexamérico con su receptor, que subsecuentemente induce la señalización para ejercer sus funciones biológicas. La formación de dicho complejo conduce a la activación de *Janus* quinasas asociadas a gp130 (JAK), la activación de diferentes vías de

señalización (JAK/STAT, MAPK) y la posterior activación de los genes responsables de ejercer la función biológica (van Wagoner *et al.*, 1999).

La IL-6 se une en primer lugar al el receptor de IL-6  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ) y el complejo IL-6/IL-6R $\alpha$  luego se asocia con gp130. El receptor IL-6R $\alpha$  se puede encontrar anclado a la membrana o también de forma soluble (sIL-6R), para unirse a su respectivo ligando y funcionar a través de gp130. Cabe señalar que el receptor IL-6R $\alpha$  y gp130 presentan un domino conservado que se caracteriza por tener cuatro residuos de cisteína en su extremo amino terminal y un motivo WSXWS (W por triptófano, S por serina, X por un residuo aminoacil no conservado) en el extremo carboxilo terminal. Además, el domino conservado se compone por dos módulos de fibronectina tipo III. Por su parte, gp130 tiene la peculiaridad de estar compuesto en su región extracelular por seis de estos módulos, mientras que la región extracelular de IL-6R posee un dominio tipo inmunoglobulina (Ig) (Taga y Kishimoto, 1997) (Fig.11).



**Fig. 11. Señalización de IL-6 (Adaptado de Taga y Kishimoto., 1997).** Se muestra la estructura esquemática del receptor de IL-6 y de gp130, además, se aprecia la interacción del complejo IL-6/IL-6R

(sIL-6R) con gp130, lo cual conduce a la activación de diferentes vías como JAK/STAT y MAPK.

De manera interesante, se ha encontrado que la IL-6 es un importante regulador de la neurogénesis, proceso que se ha sugerido es importante para la función cognitiva, así como la consolidación de la memoria y algunos tipos de aprendizaje dependientes del hipocampo (como el aprendizaje espacial) (Bruehl-Jungerman *et al.*, 2005; Drapeau *et al.*, 2003; Saxe *et al.*, 2007; Shors *et al.*, 2002). Vallieres *et al.* (2002), demostraron con ratones transgénicos que la sobreexpresión de IL-6 por astrogliosis reduce en un 63% la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Por otra parte, se ha vinculado el aumento de los niveles de IL-6 con la disfunción de las células madre neurales y con una disminución de aprendizaje y memoria (Monje *et al.* 2003). Otros hallazgos, han demostrado que la exposición a largo plazo de IL-6 que se da en el envejecimiento normal y en ciertas enfermedades neurodegenerativas puede interferir con el funcionamiento cognitivo y afectar a la neurogénesis adulta (Godbout y Johnson, 2004).

Para aclarar si los niveles basales de IL-6 durante la salud participan en procesos cognitivos Braidão *et al.*, 2004, demostraron con ratones transgénicos que no expresan IL-6 que éstos tienen un funcionamiento cognitivo mejorado en pruebas de aprendizaje de laberinto radial y un efecto amnésico reducido de la escopolamina durante la prueba de evitación pasiva en comparación con ratones control. Por otro lado, la investigación de Hryniewicz *et al.* (2007), ha demostrado que la deficiencia de IL-6 interrumpe la memoria de reconocimiento de objetos, sugiriendo que los ratones transgénicos a IL-6 no distinguen los objetos novedosos de los objetos familiares. Para explicar estos resultados, algunos trabajos explican que los niveles basales de IL-6 influyen en la neurogénesis, que a su vez interviene en algunos tipos de formas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo pero no otros. A pesar de resultados aparentemente opuestos, estos dos experimentos demuestran que la IL-6 endógena desempeña un papel importante en la función cognitiva durante condiciones fisiológicas (McAfoose y Baune, 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que la IL-6 influye en la plasticidad sináptica (Balschun *et al.*, 2004, Jankowsky y otros, 2000, Li y otros, 1997, Tancredi *et al.*, 2000). Li *et al.* (1997), demostraron que la IL-6 exógena puede suprimir la inducción de LTP sin alterar la LTP previamente establecida. Este efecto inhibitorio de la IL-6 sobre la plasticidad sináptica, a su vez,

fue demostrado posteriormente por Tancredi et al. (2000), donde se encontró que ello es mediado a través de la proteína quinasa ERK activada por mitógeno (MAPK / ERK). Además, la demostración de que la IL-6 está regulada positivamente después de la inducción de LTP (Jankowsky et al., 2000) ha proporcionado evidencia adicional de que la IL-6 puede estar involucrada en la plasticidad sináptica. Aunado a lo anterior, se ha formulado la hipótesis de que la IL-6 en condiciones basales puede regular o afinar la consolidación de la plasticidad sináptica a largo plazo y el aprendizaje dependiente del hipocampo al oponerse a los efectos de la IL-1 sobre el mantenimiento de LTP y/o acortando la mejora sináptica en las sinapsis vecinas (Jankowsky et al., 2000; Balschun et al., 2004).

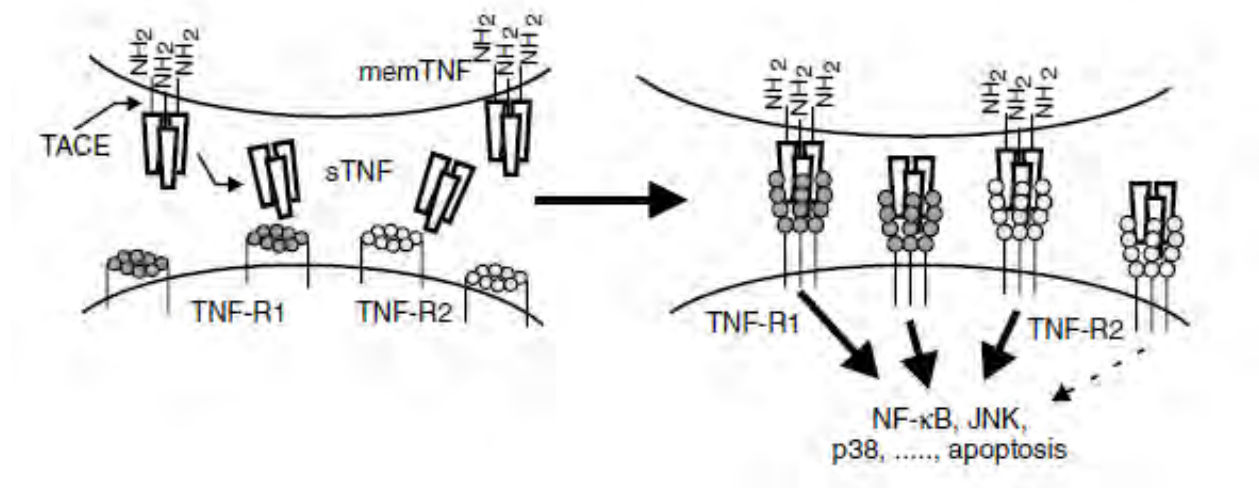
#### **1.16.1.2 TNF- $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral es una citocina proinflamatoria que se ha demostrado que ejerce funciones fisiológicas, neuroprotectoras (Cheng *et al.*, 1994; Gemma *et al.*, 2007; Pan y Kastin, 2001; Schwartz *et al.*, 1994) y neurodegenerativas (Perry *et al.*, 2001) dentro del sistema nervioso. Estos efectos pleiotrópicos son ejercidos por el TNF a través de la activación de dos receptores, el receptor TNF-p55 y el receptor TNF-p75, a menudo denominados TNF-R1 y TNF-R2 respectivamente (Baud y Karin, 2001).

El TNF se produce principalmente como una proteína transmembrana dispuesta en homotrímeros estables (Kriegler *et al.*, 1998). A partir de esta forma integrada a la membrana (memTNF), la citocina homotrimérica soluble (sTNF) se libera a través de la escisión proteolítica mediante la enzima convertidora del TNF- $\alpha$  (TACE) (Black *et al.*, 1997). Los miembros de la familia de ligandos TNF ejercen sus funciones biológicas a través de la interacción con sus receptores de membrana afines, que comprenden a la familia del receptor de TNF (TNF-R), mientras memTNF activa a TNF-R1 y TNF-R2, sTNF estimula predominantemente a TNF-R1 y tiene limitadas capacidades de señalización en TNF-R2. Tras estas interacciones se ejercen las funciones biológicas de TNF a través de la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), la activación de quinasas c-Jun N-terminal (JNK), la activación de la cascada de señalización p38-MAPK y mecanismos moleculares que inducen la muerte celular (Wajant *et al.*, 2003) (Fig.12). Estos receptores se caracterizan por contener de una a seis repeticiones ricas en cisteína en su dominio

extracelular, típicamente cada uno con tres puentes de cisteína (Naismith y Sprang, 1998). Se cree que estos dominios median la interacción homofílica de moléculas receptoras en ausencia de ligando, formando dominios de ensamblaje de unión preligando (PLAD) (Chan *et al.*, 2000) que pueden, por lo tanto, mantener a los receptores en un estado silencioso (Wajant *et al.*, 2003).

TNF-R1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, mientras que la expresión de TNF-R2 está altamente regulada y típicamente se encuentra en las células del sistema inmune. Estos receptores provocan diferentes respuestas moleculares y celulares (Baud y Karin, 2001; Chen y Goeddel, 2002; MacEwan, 2002; Wajant *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que TNF-R1 inicia la activación de las caspasas y, en última instancia, la apoptosis (MacEwan, 2002). Esta vía intracelular de señalización parece activarse por un dominio citoplásmico específico identificado en TNF-R1, denominado "dominio de la muerte" (death domain). TNF-R2 por su parte, carece de este "dominio de la muerte" y parece inhibir la activación de las caspasas y proteger contra la apoptosis; aunque hay alguna evidencia que sugiere que la activación de TNF-R2 puede inducir la muerte celular (Wajant *et al.*, 2003).



**Fig. 12. Señalización de TNF (Wajant *et al.*, 2003).** El TNF unido a la membrana (memTNF) y el TNF soluble (sTNF) derivado del mismo, se unen a dos miembros de la superfamilia del receptor de TNF, TNF-R1 y TNF-R2. Mientras que memTNF activa ambos receptores de TNF, sTNF estimula predominantemente TNF-R1 y tiene capacidades de señalización limitadas en TNF-R2.

El TNF es producido principalmente por macrófagos, pero también por una amplia variedad de

tejidos distintos, incluyendo células linfoides, mastocitos, células endoteliales, fibroblastos y tejido neuronal. Se liberan grandes cantidades de sTNF en respuesta a lipopolisacáridos y otros productos bacterianos. En combinación con otras citocinas, se considera que el TNF es un agente clave en el desarrollo del choque séptico (Mannel y Echtenacher, 2000). Mientras que las altas concentraciones de TNF inducen síntomas parecidos a los de un shock, la exposición prolongada a bajas concentraciones de TNF puede provocar caquexia, lo cual se puede encontrar, por ejemplo en pacientes con tumores. De hecho, el mediador biológico de la caquexia, fue originalmente descrito en un modelo animal de infección por tripanosoma y por lo tanto llamado caquectina, y más tarde se le denominó TNF (Beutler *et al.*, 1985).

TNF ejerce un amplio espectro de bioactividad y la mayoría de las células muestran al menos cierta capacidad de respuesta a TNF. En general, se puede considerar que representa un importante mediador proinflamatorio, con una capacidad opcional para inducir la apoptosis. En situaciones patofisiológicas, TNF muestra una notable dualidad funcional, estando fuertemente comprometido tanto en la regeneración / expansión del tejido como en la destrucción de éste. Un ejemplo de ello es el papel del TNF en la neurodegeneración, donde se ha demostrado con ratones transgénicos que su sobreexpresión en el SNC induce la infiltración de células T CD4 + y CD8+, astrocitosis, microgliosis y desmielinización (Prober *et al.*, 1995). Aunque a partir de estos modelos animales transgénicos, la señalización de TNF y TNF-R se ha implicado como importante para el inicio de la enfermedad desmielinizante, también ha reconocido como una citocina reactiva que se regula positivamente en respuesta a la lesión traumática y excitotóxica del cerebro, lo que puede ejercer funciones protectoras (Wajant *et al.*, 2003).

Diferentes investigaciones muestran un avance considerable en la comprensión de la bioactividad del TNF dentro del SNC. Por ejemplo, el TNF tiene la propiedad de actuar como un neuromodulador dentro del cerebro (Blatteis, 1990; Szelenyi, 2001; Vitkovic *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que el TNF juega un papel importante en la excitotoxicidad y en la transmisión de glutamato (inhibiendo los transportadores de glutamato en los astrocitos) (Pickering *et al.*, 2005). Más específicamente, Beattie *et al.* (2002) demostraron que el TNF derivado de glia influye notablemente en la eficacia sináptica al regular positivamente la expresión de receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónicos (AMPA). En apoyo de estos hallazgos, Stellwagen *et al.*



(2005) establecieron que la regulación positiva de los receptores AMPA por TNF está mediada por procesos dependientes de TNFR1 y fosfatidilinositol 3 (PI3) quinasa. Así mismo, estos investigadores determinaron que TNF simultáneamente disminuye la inhibición sináptica a través de la endocitosis de los receptores GABA<sub>A</sub> (Stellwagen et al., 2005). Tales hallazgos apoyan la idea de que TNF tiene un papel neuromodulador dentro del cerebro y sugieren un posible rol en la plasticidad sináptica.

La investigación de Tancredi et al. (1992) y Cunningham et al. (1996), pero no otros (Stellwagen y Malenka, 2006) han demostrado que los niveles fisiopatológicos de TNF inhiben LTP en la circunvolución dentada de rebanadas de hipocampo de rata. En apoyo de estos hallazgos, Butler et al. (2004) determinaron que el efecto inhibitor del TNF sobre la LTP es una respuesta bifásica. Investigaciones posteriores (Cumiskey et al., 2007) demostraron además que la inhibición de la LTP por TNF depende de la activación del receptor TNF-R1 y mGlu5. En una serie de experimentos elegantes, Stellwagen y Malenka (2006) demostraron que el TNF glial endógeno desplaza las neuronas hacia más excitación y menos inhibición, lo cual respalda que las células gliales desempeñan un papel esencial en el procesamiento neuronal, la integración sináptica y la sinaptogénesis (Bains y Oliet, 2007; Bezzi y Volterra, 2001; Halassa et al., 2007a; Slezak y Pfrieder, 2003; Turrigiano, 2006; Vesce et al., 2001). Además, se ha demostrado que la presencia de TNF, en ratones, en condiciones inmunológicamente no desafiadas es esencial para las funciones normales de la memoria y el aprendizaje (Baune et al., 2008). Deterioro cognitivo se ha demostrado en ratones transgénicos que sobreexpresan TNF (Aloe y col., 1999, Campbell et al., 1997; Fiore et al., 1996, 2000). Esta disminución relacionada con la expresión del TNF en la función cognitiva podría relacionarse con cambios en plasticidad sináptica (Small, 2008; Tobinick y Gross, 2008).

## **1.14 GLIA Y NEUROINFLAMACIÓN**

La glía en el SNC ayuda a mantener la homeostasis en el cerebro y colabora para una función neuronal eficiente. La microglia como tal, son las células inmunes innatas del cerebro que median respuestas ante patógenos y daño. Como se ha mencionado previamente, la glía tiene una participación importante en la neuroinflamación, donde algunos de estos tipos celulares tienen la

capacidad de tener un fenotipo activado que posee una aportación importante para la inflamación al tener la capacidad de secretar citocinas proinflamatorias entre las que se encuentran las descritas con anterioridad: IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Así mismo, incluso el término neuroinflamación se ha utilizado como sinónimo para referirse a activación glial.

Aunque la neuroinflamación se reconoce cada vez más como un sello distintivo en diversos desórdenes psiquiátricos (Solmi et al., 2015), menos atención se ha puesto al estudio de los procesos inflamatorios que podrían ocurrir en trastornos psiquiátricos y alimenticios como la anorexia.

## 2. ANTECEDENTES

A continuación se enlistan estudios donde se ha reportado que el hipocampo es afectado en un estado de anorexia:

1. Trabajos de resonancia magnética cerebral (RM) encontraron que los pacientes con AN presentan una reducción significativa del volumen total del hipocampo, sugiriendo un posible rol causal de esta estructura con la patogénesis de la enfermedad (Giordano et al., 2001).
2. Estudios previos con el modelo de anorexia ABA reportaron proliferación celular disminuida en el GD, lo que podría afectar primariamente la gliogénesis del hipocampo (Barbarisch, et al., 2013).
3. Ratones homocigotos para la mutación letal de anorexia autosómica recesiva (*anx*) mostraron una menor expresión de c-Fos en CA3 y el GD del hipocampo (Kim et al., 2001), lo que se asoció a un fenotipo anoréxico, ya que presentan peso corporal reducido, disminución de la ingesta de alimentos y comportamiento anormal como temblores corporales, hiperactividad y descoordinación marcha.
4. Además, estudios recientes con el modelo AID, reportaron un incremento de la densidad de astrocitos reactivos en la región CA2 y GD del hipocampo (Reyes et al., 2016), esto podría implicar

alteraciones en la densidad de la microglía.

5. Se conoce que la activación de la microglía y los astrocitos se produce con un patrón espacial y temporal distinto, de manera que la microglía se activa antes y promueve a su vez la activación astrocítica. Por otro lado, los astrocitos activados facilitan la activación de microglía distante y también son capaces de inhibir las actividades microgliales (Liu et al., 2011). De la misma forma, estudios recientes han demostrado que la microglía activada induce a astrocitos reactivos neurotóxicos (A1) en ratones tratados con una inyección sistémica de lipopolisacárido (LPS) (Liddelow et al., 2017).

6. Finalmente, se ha reportado que la microglía posee receptores funcionales para la leptina, hormona relacionada con la disminución del apetito, por la inducción de IL- $\beta$  y TNF- $\alpha$  cerebral (Lafrance et al., 2010).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El conocimiento sobre la neurobiología de la anorexia es limitado, sin embargo, estudios recientes reportaron un incremento en la densidad de los astrocitos reactivos en la región CA2 y GD del hipocampo en el modelo AID, lo que podría implicar alteraciones en la densidad de la microglía. Un incremento en la densidad de la glía reactiva podría resultar en una mayor expresión de moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o la interleucina 6 (IL-6). Considerando en conjunto la evidencia anteriormente expuesta, resulta relevante determinar si el aumento de astrocitos reactivos en el hipocampo de la rata bajo el modelo AID se acompaña de cambios en la densidad de la microglía y la expresión de moléculas pro-inflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

### **4. HIPOTESIS**

La anorexia inducida por deshidratación (AID) altera la densidad de la microglía en el hipocampo de ratas y la expresión de moléculas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ .

## **5. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la AID sobre la densidad de la microglía y la generación de moléculas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) en el hipocampo de la rata

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar el efecto de la AID sobre la densidad de la microglía
- Analizar si la AID altera la relación microglía activa – microglía en reposo
- Determinar si la AID afecta la expresión de la proteína Iba-1 (Molécula adaptadora de unión de calcio ionizada 1)
- Definir si la AID altera la expresión de la IL-6 y TNF- $\alpha$ .

## **6. MATERIAL Y METODOS**

### **6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES**

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM y se llevaron a cabo con estricto cumplimiento de las normas éticas aprobadas por la Guía Nacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron ratas hembra Wistar de entre 180 a 200 gramos de peso alojadas individualmente en ciclos de 12 hrs luz/ 12 hrs oscuridad, con temperatura y humedad controladas, alimento y agua *ad libitum*.

### **6.2 MODELO DE ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN**

Se siguió el protocolo experimental previamente reportado por Watts para el modelo de AID (Watts, 1998; De Gortari et al., 2009; Reyes et al, 2015). Realizando tres series experimentales independientes de 12 animales cada una, que se colocaron en jaulas individuales, de las cuáles para cada serie, los animales se seleccionaron al azar para formar los tres grupos, con una n=4 por grupo para cada serie.

El grupo CTRL recibió alimento y agua filtrada *ad libitum*. El grupo DIA recibió una solución de NaCl al 2.5% como líquido para beber y acceso sin restricción al alimento. El grupo FFR, que consistió en un control positivo para distinguir entre los efectos producidos por el hambre y la deshidratación, recibió agua filtrada *ad libitum* y la misma cantidad de alimento consumida por los animales del grupo DIA el día anterior. El protocolo experimental se llevó a cabo durante cinco días, en los cuales el consumo de alimento y el peso corporal de cada rata fue registrado diariamente a medio día para cada grupo experimental.

### **6.3 HISTOLOGÍA**

Al quinto día del modelo experimental de anorexia, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/kg) y se perfundieron vía transcardiaca con 100 ml de solución salina seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PFA, pH 7.4) para la fijación del tejido. Posteriormente, el cerebro fue aislado y postfijado en PFA al 4% por 24 hrs adicionales. Al día siguiente los cerebros fueron crioprottegidos en gradientes de sacarosa en PBS (de 10 al 30%, 24 hrs en cada gradiente). Se utilizó un criostato (Leica CM1850) para obtener cortes histológicos coronales de 30 µm que incluían el hipocampo, los cortes se colectaron y almacenaron en una solución anticongelante (30% etilenglicol / 20% glicerol en buffer fosfato salino) a -20°C para su posterior uso en experimentos de inmunofluorescencia (Cabrera et al., 2013; Reyes-Haro et al., 2015, 2016).

### **6.4 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA**

La inmunorreactividad para el adaptador de unión de calcio ionizado (Iba1), un marcador

específico para la microglía, se realizó en las rebanadas obtenidas para cada grupo experimental. Se realizaron lavados de las secciones en tampón PBS tres veces, seguido de un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 10 min, se enjuagaron otras tres veces en PBS y se incubaron en borohidruro sódico al 1.0% durante 6-8 min para reducir los aldehídos libres. Posteriormente, el tejido se colocó en solución de bloqueo (5% de albúmina de suero de caballo / 1% de Triton X-100 en PBS) durante 1 hr. Las secciones se incubaron durante la noche con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba1 (dilución 1: 1000, Wako, Life sciences). Después del lavado, el anticuerpo primario se detectó con Alexa 594 (1: 500, Invitrogen) acoplado al anticuerpo de cabra anti-conejo. Las secciones se contratiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se montaron en laminillas correspondientes a cada grupo experimental con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.).

Las secciones coronales que contenían el hipocampo montadas en portaobjetos se fotografiaron con una cámara digital (Photometrics Cool Snap FX, EE. UU.) acoplada a un microscopio Nikon (Nikon Eclipse E600, Tokio, Japón), y las imágenes se analizaron usando IMAGE J versión 1.41 (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

El microscopio confocal Zeiss LSM 780 Meta (Zeiss, Göttingen, Alemania) se utilizó para imágenes confocales con Alexa 594 (longitud de onda de excitación / emisión 590/617 nm) y DAPI (longitud de onda de excitación / emisión 350/460 nm) (Anexo A2).

## **6.5 CONTEO CELULAR**

La cuantificación de las células Iba1<sup>+</sup> se comparó con los núcleos marcados con DAPI para cada región del hipocampo: CA1, CA2-CA3 y giro dentado (GD). Se usaron un total de 2-3 campos aleatorios en cada una de las tres secciones cerebrales seleccionadas del hipocampo de 12 ratas por grupo para el conteo celular. Se utilizó una cuadrícula de prueba de 100 x 100 μm (0,01 mm<sup>2</sup>) para estimar el número de núcleos teñidos con DAPI y células IBA1<sup>+</sup> manualmente y con Cell Profiler (Lamprecht et al., 2007, Reyes-Haro et al., 2015, 2016). Cabe señalar que sólo se contaron las células que mostraban su soma en el plano del área analizada y se estimó su densidad (número de células por mm<sup>2</sup>). La relación microglía / núcleos se calculó dividiendo el número de células Iba1<sup>+</sup>

entre el número total de núcleos marcados con DAPI. Por otra parte, para los conteos de microglia activa y en reposo, se utilizaron criterios morfológicos donde la microglía en reposo se identificó mediante un pequeño soma redondo con procesos finos y altamente ramificados, mientras que la microglía reactiva se definió por un cuerpo celular pleomórfico con procesos celulares acortados (Cerbai et al., 2012; Rinaldi et al., 2015).

Todos los datos correspondientes a cada grupo experimental y a cada región del hipocampo se promediaron y el análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Bonferroni, para lo cual se utilizó el software Origin 7.0. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **6.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT**

### **6.6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Todo el hipocampo fue diseccionado como se describió previamente (Reyes-Haro et al., 2016). El hipocampo de tres ratas diferentes para cada grupo experimental (Control, DIA y FFR) se homogenizó en buffer de lisis (glicina 200 mM, NaCl 150 mM, EGTA 50 mM, EDTA 50 mM y sacarosa 300 mM) con un inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 10,000 Xg por 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue alicuotado y conservado a -80 °C. La concentración para cada muestra de proteínas fue estimada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **6.6.2 ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS**

Alícuotas con una concentración de 30 µg de proteínas para cada muestra fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% en tampón Tris-Glicina a 80 V por 4 horas. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de PVDF en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3) a 30 V por 2 horas en cámara fría.

### **6.6.3 INMUNODETECCIÓN**

Para la inmunodetección se bloquearon las membranas con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-Tween20 por 3 horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4° C, durante la noche con cada uno de los siguientes anticuerpos primarios: (a) anti-IBA1 de conejo policlonal (dilución 1: 5000, Wako); (b) anti-TNF $\alpha$  de ratón monoclonal (dilución 1: 1000, Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.); (c) anti-IL6 de ratón monoclonal (dilución 1: 1000, Santacruz, Dallas, TX, EE.UU.) y (d) anti-GAPDH de ratón monoclonal (dilución 1: 1000, Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y los anticuerpos unidos se detectaron incubando durante 3 h con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-ratón de cabra (dilución 1: 2500; Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.) o el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-conejo de cabra (dilución 1: 2500; Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.). La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó usando el kit de reacción del sustrato conjugado BCIP / NBT conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad, EE. UU.).

Las imágenes se adquirieron con un sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE. UU.) y se midió la densidad óptica de la cantidad traza para cada banda utilizando el software Image Lab 3.0 (Bio-Rad Laboratories Inc).

### **6.7 TINCIÓN CON FLUORO JADE C**

Adicionalmente, se evaluó la neurodegeneración en el tejido correspondiente a cada grupo mediante el método de Fluoro Jade C. Las secciones de tejido se montaron y se secaron en portaobjetos tratados con poli-L-lys. El tejido se rehidrató en las siguientes soluciones: 1% de NaOH / 80% de etanol (EtOH) durante 5 minutos, 70% de EtOH durante 2 minutos y agua destilada (ddH<sub>2</sub>O) durante 2 minutos. Las secciones se fijaron en una solución de KMnO<sub>4</sub> al 0,06% durante 10 min en un agitador seguido de enjuague con ddH<sub>2</sub>O durante 2 min. Posteriormente, las secciones fueron incubadas en 0.0004% Fluoro-jade C/ 0.1% de solución de ácido acético por 20 min y lavadas en ddH<sub>2</sub>O tres veces durante 5 minutos cada una. Las secciones de tejido se secaron a 50°C durante 5 a 10 min y se montaron con DPX (Vanoye et al., 2008).

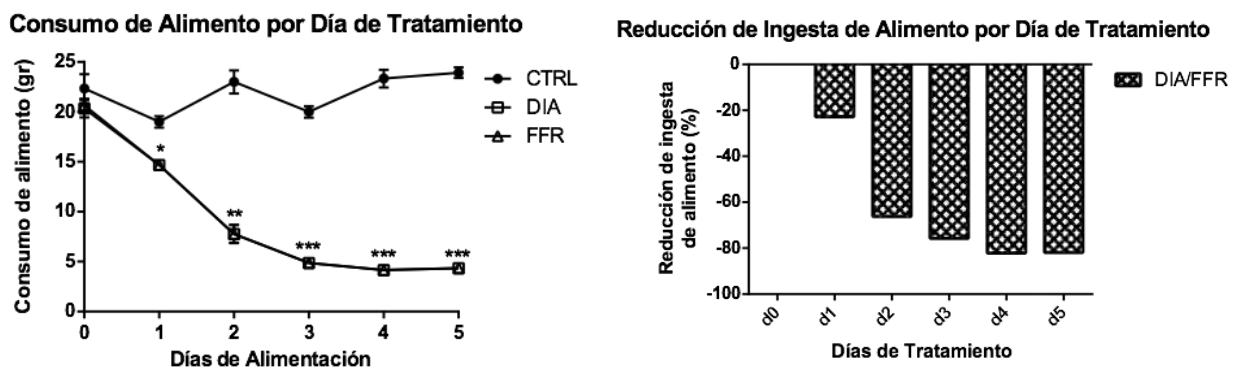


Las secciones coronales que contenían el hipocampo y teñidas con Fluoro Jade C se fotografiaron a una magnificación de 25X y las imágenes se analizaron usando IMAGE J versión 1.41 (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.), donde se estimó la intensidad de la señal para medir la neurodegeneración en el tejido. Posteriormente se calculó el porcentaje de la intensidad de señal para el grupo DIA y FFR con respecto al control (Apéndice A4).

## 7. RESULTADOS

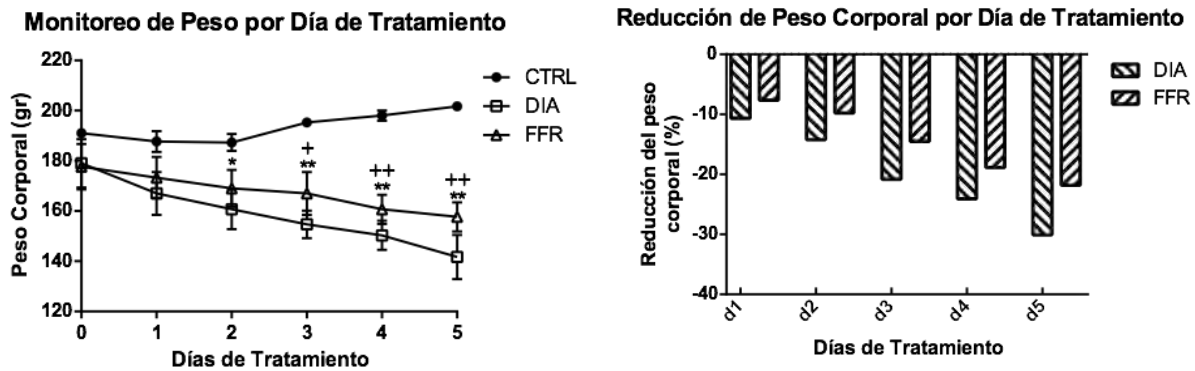
### 7.1 MONITOREO DE PESO Y CONSUMO DE ALIMENTO

El protocolo de AID se llevó a cabo durante cinco días, en los que se monitoreó diariamente el consumo de alimento así como el peso de los animales. Los resultados mostraron una disminución progresiva del consumo de alimento, que fue significativa a partir del primer día de tratamiento en los grupos DIA y FFR ( $14.67 \pm 0.3333$  gramos;  $n=12$ ) en comparación con el control ( $19.00 \pm 0.5774$  gramos;  $n=12$ ) ( $p<0.05$ ), donde la alimentación se ve disminuida en un 20%. Asimismo se observó la mayor diferencia al quinto día del modelo, siendo disminuido el consumo de alimento en un 80% con respecto al control (DIA/FFR=  $4.333 \pm 0.3333$  gramos vs CTRL=  $23.93 \pm 0.5364$  gramos;  $n=12$ ) ( $p<0.001$ ) (Fig. 13).



**Fig. 13. A, Consumo de Alimento por Día de Tratamiento.** Los resultados se presentan como la media del peso en gramos  $\pm$  SEM; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.001$  vs control;  $n=12$ . **B, Reducción de Ingesta de Alimento por Día de Tratamiento.** Se muestra el porcentaje de la reducción de la ingesta de alimento para DIA y FFR con respecto al grupo control, de acuerdo con los resultados obtenidos en A.

En cuanto al monitoreo de peso corporal por día de tratamiento, los resultados mostraron una pérdida progresiva del peso corporal en los sujetos del grupo experimental, la cual al igual que el consumo de alimento, fue aún más significativa al día cinco del modelo experimental para los grupos DIA ( $141.7 \pm 8.819$  gramos;  $n=12$ ) y FFR ( $157.7 \pm 5.783$  gramos;  $n=12$ ), que disminuyeron el peso corporal de los animales en un 30% y 20% respecto al control ( $201.7 \pm 1.202$  gramos;  $n=12$ ) ( $p<0.005$ ) (Fig.14).



**Fig. 14. A, Monitoreo de Peso por Día de Tratamiento.** Los resultados se presentan como la media del peso en gramos  $\pm$  SEM; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$  DIA vs control; + $p<0.05$ , ++ $p<0.005$  FFR vs control;  $n=12$ . **B, Reducción de Peso Corporal por Día de Tratamiento.** Se muestra el porcentaje de la reducción del peso corporal para DIA y FFR con respecto al grupo control, de acuerdo con los resultados obtenidos en A.

## 7.2 EFECTO DE LA ANOREXIA SOBRE LA DENSIDAD DE LA MICROGLIA EN EL HIPOCAMPO

Para investigar si la AID afecta la densidad de la microglia, la primera estimación realizada fue la densidad de núcleos que representa el total de las células nerviosas por  $\text{mm}^2$ , posteriormente se hicieron conteos del total de las células Iba1+ (microglia) y finalmente se obtuvo una relación entre la microglia total estimada y el número de núcleos (Apéndice A3).

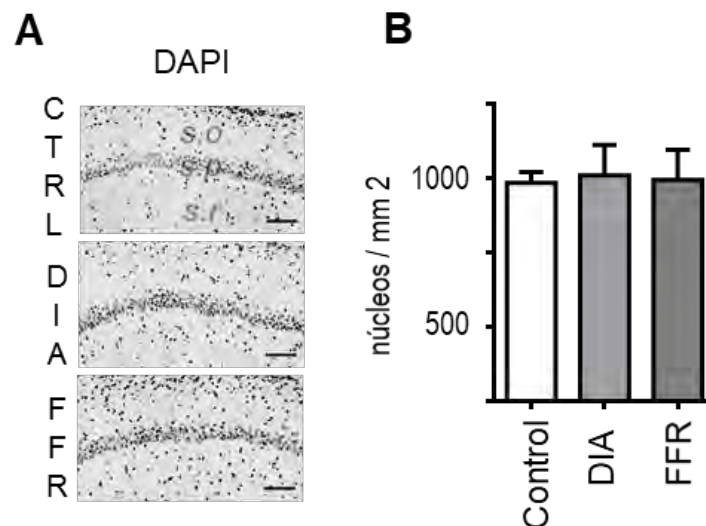
Los efectos de DIA y FFR sobre la densidad de los núcleos y microglia se estimaron para las siguientes regiones del hipocampo: CA1, CA2-CA3 y giro dentado (GD) (Figura 15-23, Apéndice A2). Todas las observaciones incluyeron el estrato radial y el estrato *oriens*, donde la microglia se

ubica preferentemente, mientras que para el GD las observaciones se realizaron en el hilio (Apéndice A2).

Los resultados mostraron un aumento significativo de la densidad de microglia del grupo DIA con respecto al grupo control en las regiones CA2-CA3 y GD del hipocampo, sin cambios en CA1. Sin embargo, tal efecto se vio acompañado por un aumento de la densidad de microglia en FFR únicamente en GD (Fig. 15-23).

### 7.2.1 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN NO AFECTA LA DENSIDAD DE LA MICROGLIA EN CA1

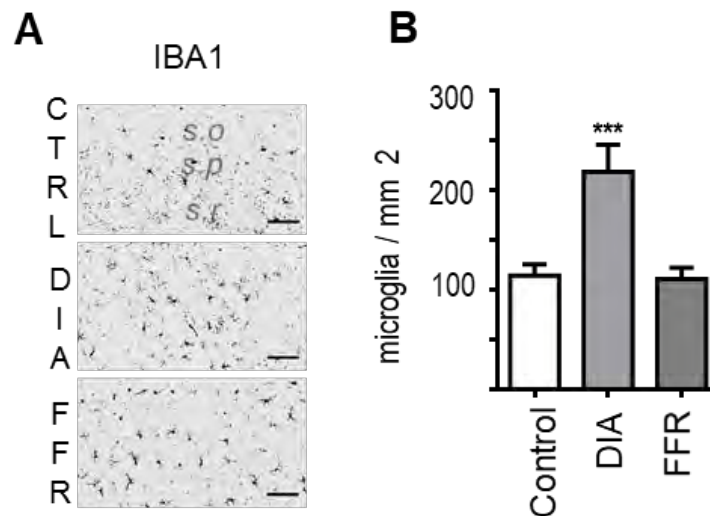
El ANOVA de una vía reveló que no existen diferencias significativas entre los tres grupos experimentales respecto a la densidad de núcleos en la región CA1 del hipocampo de ratas hembra bajo el modelo AID ( $F_{(2,33)} = 0.02161$ ,  $p = 0.97863$ ). Asimismo, la prueba de Bonferroni no mostró diferencias significativas en los grupos DIA ( $757.64 \pm 102.48$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n=12$ ) y FFR ( $743.06 \pm 100.31$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n=12$ ) respecto al grupo control ( $732.64 \pm 36.43$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n=12$ ) ( $p=1$ ) (Fig.15).



**Fig. 15. Densidad de Núcleos Teñidos por DAPI en CA1.** **A:** Se muestran microfotografías representativas por grupo experimental donde se aprecian los núcleos teñidos por DAPI en la región CA1 del hipocampo. **B:** Resultados obtenidos tras la estimación de la densidad de núcleos que representa el total de las células nerviosas por  $\text{mm}^2$ . No se encontraron diferencias significativas entre los grupos

experimentales en CA1. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; n=12.

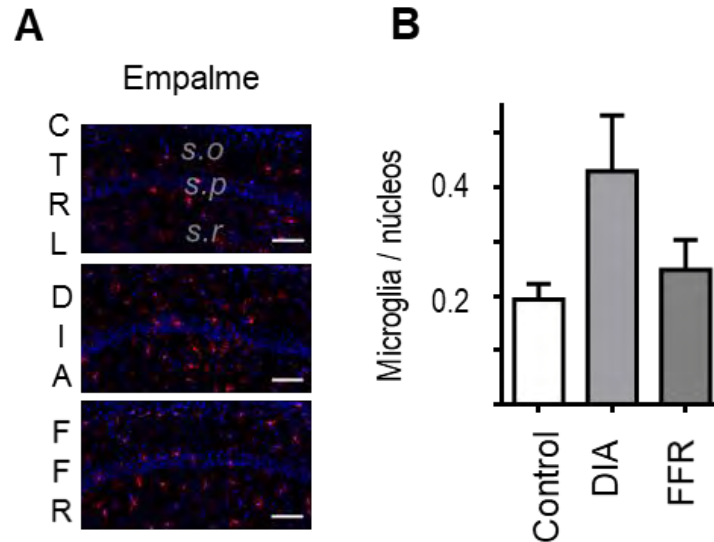
Los conteos de microglia total (células Iba1+) realizados en CA1 mostraron que existen diferencias significativas entre los grupos experimentales al día cinco del modelo de AID tras realizar el ANOVA de una vía ( $F_{(2,33)}= 11.15$ ,  $p<0.001$ ). La prueba Bonferroni, a su vez reveló que el grupo DIA presentó significativamente más células positivas a Iba1 ( $218.75 \pm 27.45$  microglia/mm<sup>2</sup>; n=12) con respecto al grupo control ( $114.58 \pm 11.20$ ; microglia/mm<sup>2</sup>; n=12) ( $p<0.001$ ), lo que representa un aumento del 91% de la microglia. En contraste, para el grupo FFR ( $111.11 \pm 11.30$  microglia/mm<sup>2</sup>; n=12) no hubo diferencias significativas con respecto al control ( $114.58 \pm 11.20$  microglia/mm<sup>2</sup>; n=12) ( $p=1$ ) (Fig.16).



**Fig. 16. Conteos de Células Iba1+ en CA1 del Hipocampo.** A: Se muestran fotomicrografías representativas por grupo experimental donde se aprecian las células Iba1+ (microglia) en la región CA1 del hipocampo. B: Resultados obtenidos tras los conteos del número de microglia/mm<sup>2</sup>, donde se encontró que sólo el grupo DIA tiene diferencias significativas con respecto al grupo control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \*\*\* $p<0.001$  vs control; n=12.

Al analizar la relación entre número de microglia y número de núcleos, el ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas entre los tres grupos del modelo de AID ( $F_{(2,33)}= 3.1677$ ,  $p=0.05515$ ). Asimismo, la prueba de Bonferroni no mostró diferencias significativas en la estimación de la relación de microglia/núcleos en los grupos DIA ( $0.42927 \pm 0.1028$ ; n=12;  $p=0.0659$ ) y FFR ( $0.24828 \pm 0.0550$ ; n=12;  $p=1$ ) respecto al grupo control ( $0.1936 \pm 0.0283$ )

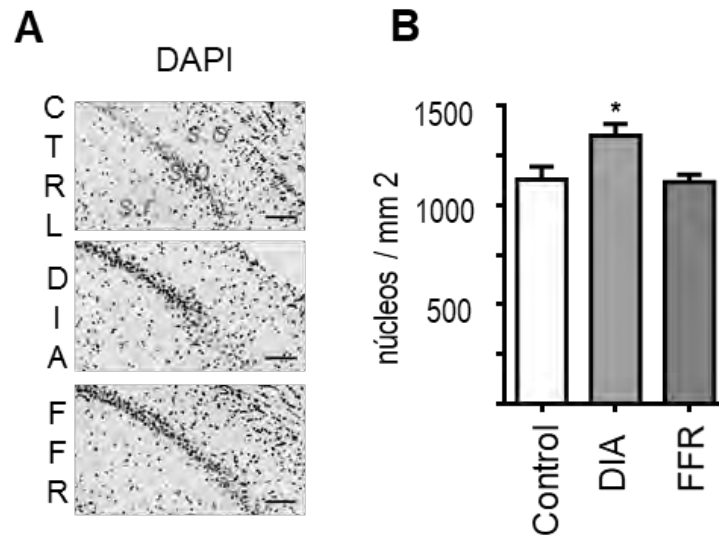
(Fig.17). Tras estos resultados se determinó que no la AID no afecta la densidad de la microglia en CA1 del hipocampo.



**Fig. 17. Relación entre Microglia y Número de Núcleos en CA1 del Hipocampo.** **A:** Se muestran fotomicrografías representativas por grupo experimental donde se aprecia el empalme de los canales que muestran los núcleos teñidos por DAPI (azul) y las células Iba1+ (rojo) en CA1. **B:** Resultados obtenidos tras estimar la relación microglia/núcleos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en CA1. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; n=12.

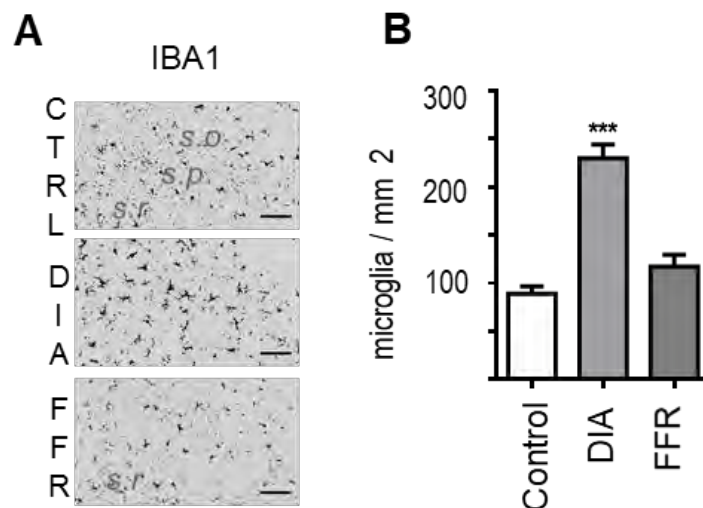
### 7.2.2 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN AUMENTA LA DENSIDAD DE LA MICROGLIA EN CA2-CA3 COMO EFECTO DE LA DESHIDRATACIÓN

En CA2-CA3, el ANOVA de una vía reveló diferencias significativas en la densidad de núcleos teñidos por DAPI entre los tres grupos experimentales del modelo de AID ( $F_{(2,33)} = 5.56059$ ,  $p = 0.00829$ ). Además, la prueba de Bonferroni mostró diferencias significativas al comparar el grupo DIA ( $1348.96 \pm 60.59$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n=12) con el control ( $1129.86 \pm 63.90$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n=12) ( $p = 0.02542$ ). El grupo FFR ( $1116.67 \pm 37.81$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n=12;  $p = 1$ ), en cambio, no mostró diferencias estadísticas (Fig.18).



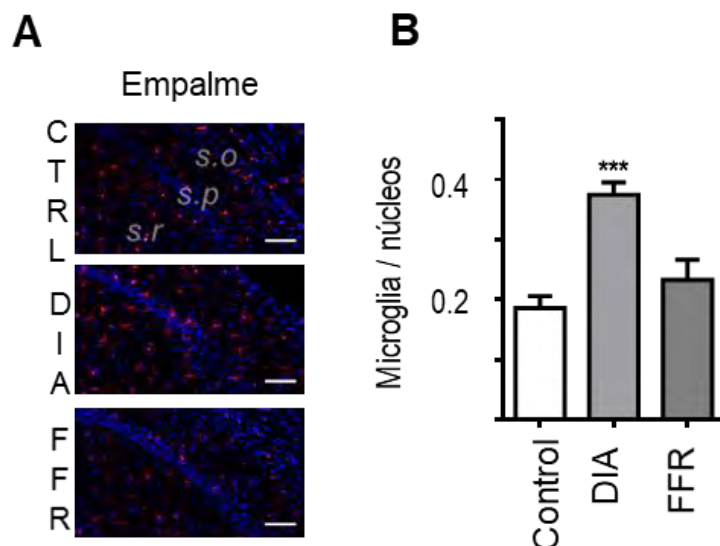
**Fig. 18. Densidad de Núcleos Teñidos por DAPI en CA2-CA3.** **A:** Se muestran microfotografías representativas por grupo experimental donde se aprecian los núcleos teñidos por DAPI en la región CA2-CA3 del hipocampo. **B:** Resultados obtenidos tras la estimación de la densidad de núcleos que representa el total de las células nerviosas por mm<sup>2</sup>, donde se encontró que el número de núcleos en el grupo DIA aumenta con respecto al control en CA2-CA3 del hipocampo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  vs control;  $n = 12$ .

El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas con respecto a la estimación de microglia total en CA2-CA3 entre los tres grupos experimentales del modelo de AID ( $F_{(2,33)} = 40.37377$ ,  $p < 0.001$ ). A su vez, al igual que en CA1, tras hacer la prueba Bonferroni se observó únicamente para el grupo DIA ( $229.86 \pm 14.23$  células Iba1+;  $n = 12$ ;  $p < 0.0001$ ) un aumento significativo en el número de microglia con respecto al control ( $89.24 \pm 7.75$  células Iba1+/mm<sup>2</sup>;  $n = 12$ ); dicho aumento fue de un 158%. Por su parte, el grupo FFR ( $117.36 \pm 12.20$  células Iba1+/mm<sup>2</sup>;  $n = 12$ ;  $p = 0.29665$ ) no fue estadísticamente diferente al control (Fig. 19).



**Fig. 19. Conteos de Células Iba1+ en CA2-CA3 del Hipocampo.** **A:** Se muestran fotomicrografías representativas por grupo experimental donde se aprecian las células Iba1+ (microglia) en CA2-CA3 del hipocampo. **B:** Resultados obtenidos tras los conteos del número de microglia/mm<sup>2</sup>, donde se encontró que sólo el grupo DIA tiene diferencias significativas con respecto al grupo control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$  vs control;  $n = 12$ .

Al calcular la proporción del número de células Iba1+ y el número de núcleos, la ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ( $F_{(2,33)} = 15.09554$ ,  $p < 0.001$ ). Tras realizar la prueba Bonferroni, por su parte se encontró que bajo el modelo de AID dicha relación aumenta significativamente en CA2-CA3 únicamente para el grupo DIA ( $0.1875 \pm 0.01037$ ;  $n = 12$ ;  $p < 0.001$ ) en comparación con el grupo control ( $0.09311 \pm 0.0098$ ;  $n = 12$ ). No se encontraron diferencias entre el grupo FFR ( $0.11664 \pm 0.0166$ ;  $n = 12$ ;  $p = 0.59207$ ) y control (Fig.20). Los resultados de esta estimación muestran así que la AID aumenta la densidad de la microglia en CA2-CA3 como efecto de la deshidratación del modelo.

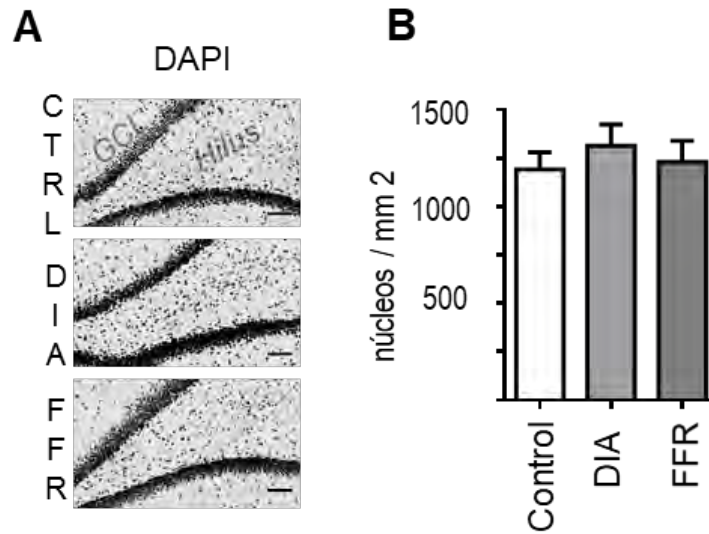


**Fig. 20. Relación entre Microglia y Número de Núcleos en CA2-CA3 del Hipocampo.** **A:** Se muestran fotomicrografías representativas por grupo experimental donde se aprecia el empalme de los canales que muestran los núcleos teñidos por DAPI (azul) y las células Iba1+ (rojo) en CA2-CA3. **B:** Resultados obtenidos tras estimar la relación microglia/núcleos, donde se encontró que el grupo DIA tiene diferencias estadísticas respecto al control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$  vs control;  $n=12$ .

### 7.2.1 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN AUMENTA LA DENSIDAD DE LA MICROGLIA EN EL GD

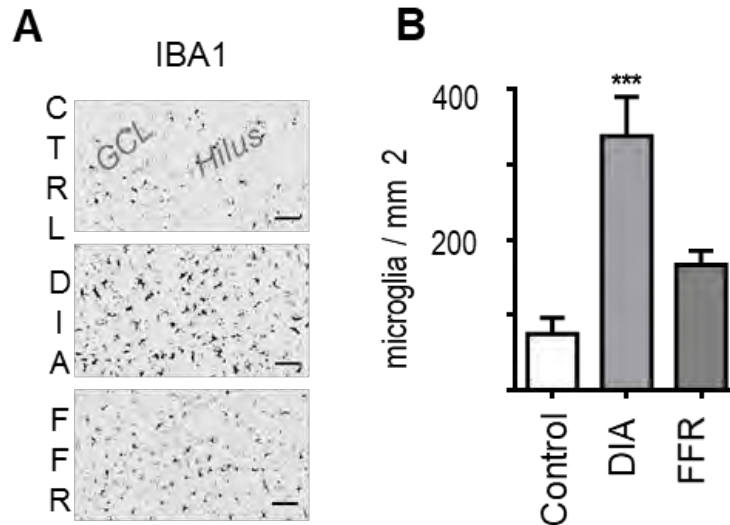
Al calcular el número de núcleos en el GD no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales tras realizar el ANOVA de una vía ( $F_{(2,33)} = 0.35293$ ,  $p=0.70525$ ). Asimismo, la prueba Bonferroni no mostró cambios estadísticos significativos entre el control ( $1191.76 \pm 88.52$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n=12$ ) y los grupos DIA ( $1312.5 \pm 111.82$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n=12$ ;  $p=1$ ) y FFR ( $1229.17 \pm 110.35$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n=12$ ;  $p=1$ ) (Fig. 21).





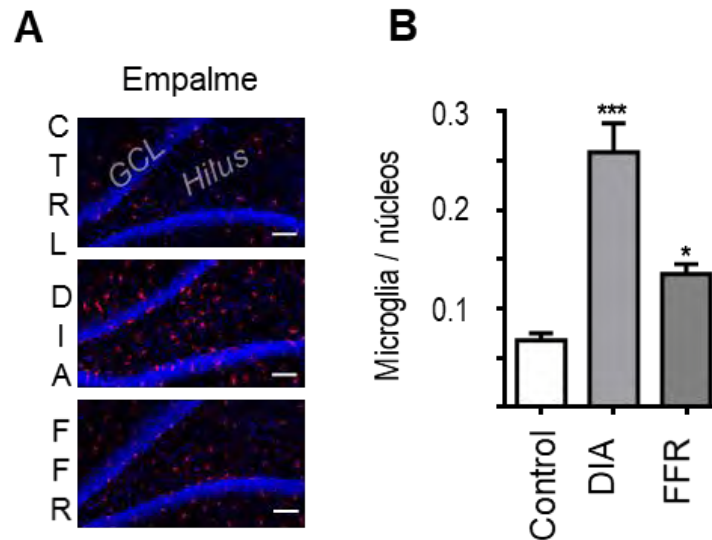
**Fig. 21. Densidad de Núcleos Teñidos por DAPI en GD.** **A:** Se muestran fotomicrografías representativas por grupo experimental donde se aprecian los núcleos teñidos por DAPI en la región del giro dentado del hipocampo. **B:** Resultados obtenidos tras la estimación de la densidad de núcleos que representa el total de las células nerviosas por mm<sup>2</sup>. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el GD. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; n=12.

Las mediciones de células Iba1+ en el giro dentado del hipocampo mostraron tras el ANOVA de una vía que existen diferencias entre los grupos experimentales ( $F_{(2,33)} = 17.41930$ ,  $p < 0.001$ ). La prueba Bonferroni, por su parte, mostró que hay un aumento de las células Iba1+ en el grupo DIA ( $337.5 \pm 51.91$  células Iba1+; n=12;  $p < 0.0001$ ) con respecto al grupo control ( $75 \pm 3.01511$  células Iba1+; n=12), aumentando en un 350%. En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo FFR ( $166.67 \pm 18.80$  células Iba1+; n=12;  $p = 0.15125$ ) y el control (Fig. 22).



**Fig. 22. Conteos de Células Iba1+ en GD del Hipocampo.** **A:** Se muestran fotomicrografías representativas por grupo experimental donde se aprecian las células Iba1+ (microglia) en el giro dentado del hipocampo. **B:** Resultados obtenidos tras los conteos del número de microglia/mm<sup>2</sup>, donde se encontró que sólo el grupo DIA tiene diferencias significativas con respecto al grupo control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$  vs control;  $n = 12$ .

Finalmente, al obtener la relación entre células Iba1+ y el total de núcleos el ANOVA de una vía mostró que existen diferencias entre los grupos ( $F_{(2,33)} = 27.43622$ ,  $p < 0.001$ ). Al realizar la prueba Bonferroni se encontraron diferencias significativas respecto al control ( $0.06755 \pm 0.00722$ ;  $n = 12$ ) tanto en el grupo DIA ( $0.25824 \pm 0.02945$ ;  $n = 12$ ;  $p < 0.001$ ) como en el grupo FFR ( $0.13477 \pm 0.01017$ ;  $n = 12$ ;  $p = 0.04418$ ), donde la densidad de la microglia se ve aumentada en un 282% y en un 99% respectivamente. Tras estos resultados se determinó que existe evidencia estadística suficiente que muestra que la anorexia aumenta la densidad de la microglia en el GD del hipocampo bajo el modelo de AID (Fig. 23).



**Fig. 23. Relación entre Microglia y Número de Núcleos en GD del Hipocampo.** **A:** Se muestran microfotografías representativas por grupo experimental donde se aprecia el empalme de los canales que muestran los núcleos teñidos por DAPI (azul) y las células Iba1+ (rojo) en el giro dentado. **B:** Resultados obtenidos tras estimar la relación microglia/núcleos, donde se encontró que dicha relación aumenta en el grupo DIA y FFR con respecto al control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  vs control, \*\*\* $p < 0.001$  vs control;  $n = 12$ .

En resumen, tras analizar los efectos de la AID en la densidad de la microglia del hipocampo se demostró que de las tres regiones analizadas (CA1, CA2-CA3 y GD), únicamente hay efectos en CA2-CA3 y GD, donde la densidad de la microglia aumenta, como efecto de la deshidratación en el primer caso y como efecto de la anorexia en el GD.

### 7.3 EFECTO DE LA ANOREXIA SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLIA EN EL HIPOCAMPO

Para analizar los efectos de DIA y FFR sobre la morfología de la microglia en el hipocampo, se realizaron diferentes determinaciones en las que se cuantificó el número de elementos celulares correspondiente a la microglia activa (con cuerpo celular pleomórfico y procesos celulares acortados) y al de la microglia en reposo (con pequeño soma redondo y procesos finos altamente ramificados) por  $\text{mm}^2$  para las siguientes regiones del hipocampo: CA1, CA2-CA3 y GD (Figura 24-26, Apéndice A2). Aunado a lo anterior, se calculó la proporción de microglia activa respecto

a la microglia en reposo (Apéndice A3). Todas las observaciones incluyeron el estrato radial y el estrato oriens, donde la microglia se ubica preferentemente, mientras que para el GD las observaciones se realizaron en el hilio (Apéndice A2).

Los resultados mostraron un aumento significativo del número de elementos celulares correspondientes a la microglia activa con respecto a la microglia en reposo en el grupo DIA y FFR con respecto al grupo control en las regiones CA2-CA3 y GD del hipocampo (Fig. 24-26).

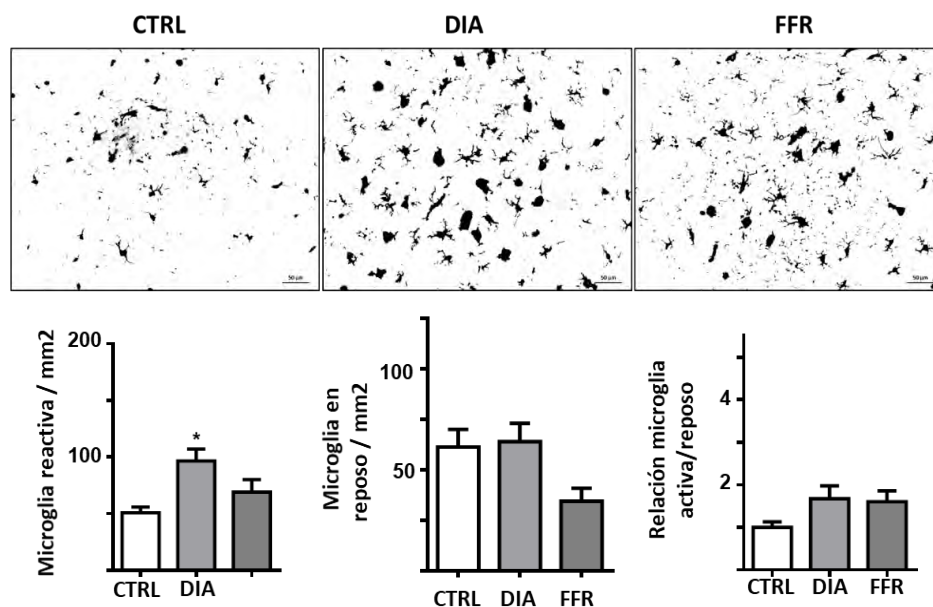
### **7.3.1 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN NO AFECTA LA RELACIÓN MICROGLIA ACTIVA / MICROGLIA EN REPOSO EN CA1**

La primer determinación que se realizó fue la medición de la microglia activa / mm<sup>2</sup> en CA1, donde el ANOVA de una vía mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $F_{(2,15)} = 6.100970$ ,  $p=0.01151$ ). Tras la prueba Bonferroni, los resultados mostraron que en CA1 hay un aumento significativo de la microglia activa para el grupo DIA ( $96.50296 \pm 10.5994$  células microgliales activas;  $n=6$ ;  $p=0.0103$ ) con respecto al control ( $50.9014 \pm 5.0791$  células microgliales activas;  $n=6$ ), donde la microglia activa se ve aumentada en un 90%. Por el contrario, para FFR ( $69.08172 \pm 10.9996$  células microgliales activas;  $n=6$ ;  $p=0.56054$ ) dicha diferencia no fue significativa (Fig. 24).

No obstante, con respecto a la determinación del número de elementos celulares correspondientes a la microglia en reposo / mm<sup>2</sup> en CA1, el ANOVA de una vía demostró que no hay evidencia estadística de que existan diferencias entre los tres grupos experimentales ( $F_{(2,15)} = 4.032210$ ,  $p=4.032210$ ). Aunado a ello, se observó que el número de microglia en reposo disminuye con respecto al grupo control ( $61.30809 \pm 8.7438$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ) únicamente para el grupo FFR ( $34.45696 \pm 6.4152$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ), aunque dicho cambio no fue estadísticamente significativo tras realizar la prueba Bonferroni ( $p=0.102$ ). No se encontraron diferencias entre el grupo DIA ( $64.02655 \pm 9.0074$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ) y control ( $p=1$ ) (Fig. 24).

Así mismo, tras realizar el ANOVA de una vía no se encontraron diferencias significativas entre

los grupos experimentales al calcular la proporción del número de elementos celulares correspondientes a la microglia reactiva con respecto a los de la microglia en reposo ( $F_{(2,15)} = 2.322660$ ,  $p=0.1322$ ). Por consiguiente, la prueba Bonferroni no mostró diferencias entre el control ( $0.99691 \pm 0.1342$ ;  $n=6$ ) y los grupos DIA ( $1.66845 \pm 0.3057$ ;  $n=6$ ;  $p=0.20829$ ) y FFR ( $1.60229 \pm 0.2557$ ;  $n=6$ ;  $p=0.29489$ ) (Fig.19). Con estos resultados se determinó que la AID no afecta la relación microglia activa / microglia en reposo en CA1 (Fig. 24).



**Fig. 24. Densidad de microglia activa y en reposo en CA1. A:** Se muestran microfotografías representativas por grupo experimental donde se aprecian células Iba1+ en CA1 con diferentes morfologías. Se distingue un mayor número de microglia activa (con cuerpo celular pleomórfico y procesos celulares acortados) en el grupo DIA. **B:** Resultados obtenidos tras realizar los conteos de microglia activa y en reposo en CA1, donde se observó un aumento en la relación microglia activa / microglia en reposo con respecto al control en DIA y FFR, aunque no fue estadísticamente significativo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \* $p<0.05$  vs control;  $n=6$ .

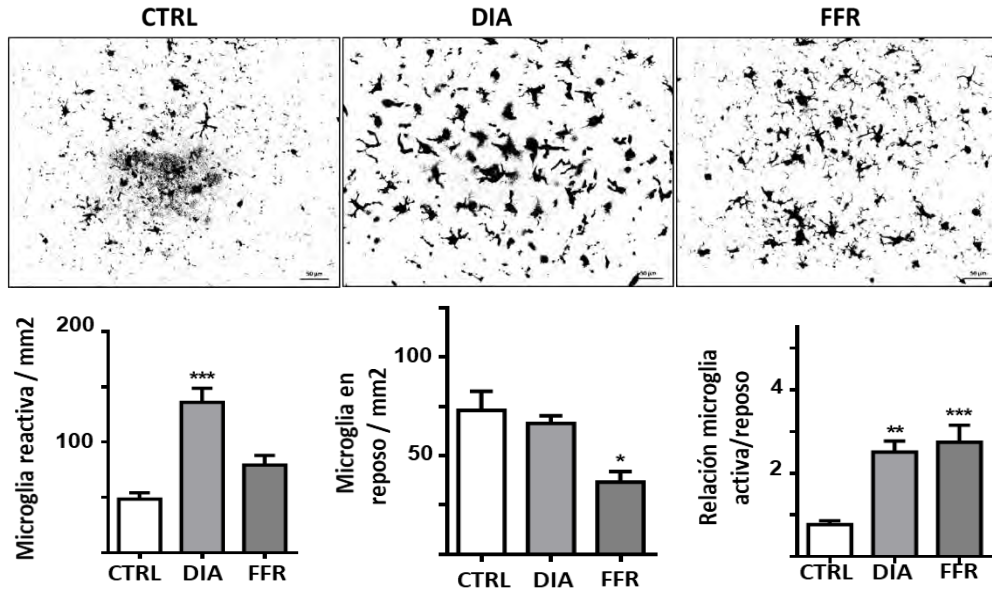
### 7.3.2 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN AUMENTA LA RELACIÓN MICROGLIA ACTIVA / MICROGLIA EN REPOSO EN CA2-CA3

Al estimar la microglia activa / mm<sup>2</sup> en CA2-CA3, el ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $F_{(2,15)} = 21.62546$ ,  $p<0.001$ ). De manera similar a

CA1, tras realizar la prueba Bonferroni, los resultados mostraron un aumento significativo de la microglia activa con respecto al control ( $48.48518 \pm 5.7941$  células microgliales activas;  $n=6$ ) únicamente para el grupo DIA ( $135.91519 \pm 12.88004$  células microgliales activas;  $n=6$ ;  $p<0.001$ ), donde la microglia activa aumentó en un 180%. Sin cambios significativos entre el control y FFR ( $79.31998 \pm 8.5627$  células microgliales activas;  $n=6$ ;  $p=0.11153$ ) (Fig. 25).

Por otra parte, al realizar la estimación de número de microglia en reposo /  $\text{mm}^2$  en CA2-CA3, el ANOVA de una vía demostró que existen diferencias sigificativas entre los tres grupos experimentales ( $F_{(2,15)} = 8.084730$ ,  $p=0.00415$ ). Aunado a ello, la prueba Bonferroni mostró que el número de microglia en reposo disminuye significativamente con respecto al grupo control ( $72.93777 \pm 9.69547$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ) únicamente para el grupo FFR ( $36.64073 \pm 5.42913$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ;  $p=0.00553$ ), disminuyendo en un 50%. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el control y el grupo DIA ( $66.38852 \pm 3.92209$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ;  $p=1$ ) (Fig. 25).

Finalmente, el ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales al obtener la relación del número de microglia reactiva con respecto a la microglia en reposo ( $F_{(2,15)} = 14.21470$ ,  $p<0.001$ ). Para CA2-CA3, la prueba Bonferroni mostró que la relación microglia activa / microglia en reposo aumenta en los grupos DIA ( $2.50632 \pm 0.26561$ ;  $n=6$ ;  $p=0.0019$ ) y FFR ( $2.74269 \pm 0.40804$ ;  $n=6$ ;  $p<0.001$ ) respecto al control ( $0.76674 \pm 0.09329$ ;  $n=6$ ) (Fig.25), dicho aumento fue de un 227% y un 258% respectivamente. Tras el análisis estadístico de estos resultados se determinó que la anorexia aumenta la relación microglia activa / microglia en reposo en CA2-CA3 bajo el modelo de AID.



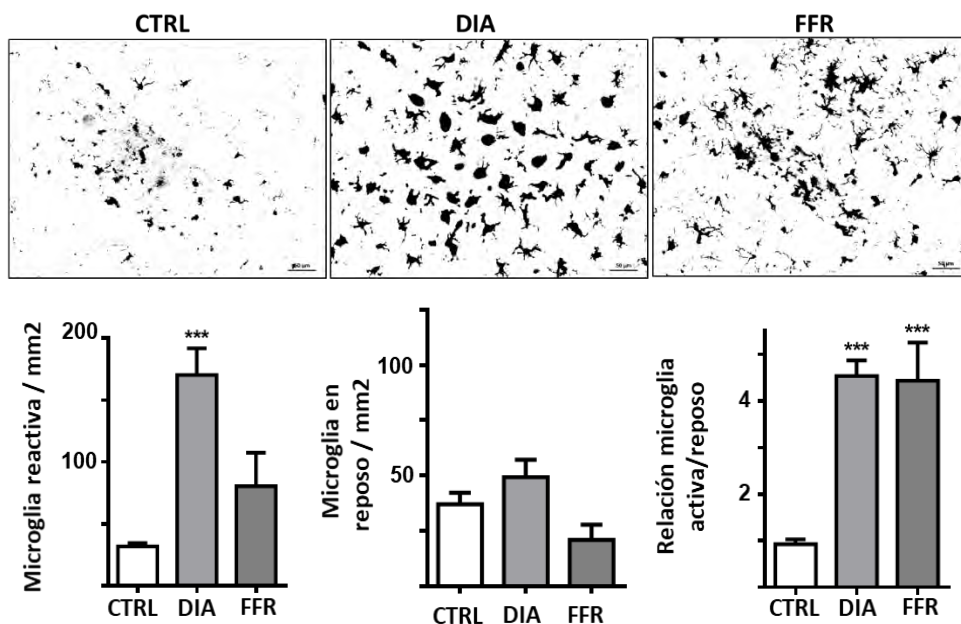
**Fig. 25. Densidad de microglia activa y en reposo en CA2-CA3.** A: Se muestran microfotografías representativas por grupo experimental donde se aprecian células Iba1+ en CA2-CA3 con diferentes morfologías. Se distingue un mayor número de microglia activa (con cuerpo celular pleomórfico y procesos celulares acortados) en el grupo DIA y FFR que en el control. B: Resultados obtenidos tras realizar los conteos de microglia activa y en reposo en CA2-CA3, donde se observó un aumento significativo en la relación microglia activa / microglia en reposo en el grupo DIA y FFR con respecto al control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control;  $n = 6$ .

### 7.3.3 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN AUMENTA LA RELACIÓN MICROGLIA ACTIVA / MICROGLIA EN REPOSO EN EL GIRO DENTADO

En el giro dentado, tras realizar el ANOVA de una vía las mediciones de microglia activa / mm<sup>2</sup> mostraron que existen diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $F_{(2,15)} = 21.89490$ ,  $p < 0.001$ ). A su vez, la prueba Bonferroni, mostró que la microglia activa aumenta significativamente con respecto al control ( $31.86473 \pm 2.89959$  células microgliales activas;  $n = 6$ ) únicamente para el grupo DIA ( $170.36939 \pm 21.48829$  células microgliales activas;  $n = 6$ ;  $p < 0.001$ ), donde la microglia activa se ve aumentada en un 435%. No se encontraron diferencias significativas entre el control y FFR ( $79.85803 \pm 14.4087$  células microgliales activas;  $n = 6$ ;  $p = 0.11788$ ) (Fig. 26).

Al realizar la estimación de número de microglia en reposo / mm<sup>2</sup> en el GD, el ANOVA de una vía demostró que existen diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ( $F_{(2,15)} = 6.912740$ ,  $p=0.00745$ ). Sin embargo, la prueba Bonferroni no mostró cambios significativos en el grupo DIA ( $49.30611 \pm 7.9445$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ;  $p=0.43432$ ) y FFR ( $19.86444 \pm 2.35011$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ;  $p=0.14147$ ) con respecto al control ( $37.06722 \pm 5.1281$  células microgliales en reposo;  $n=6$ ) (Fig. 26).

Finalmente, al obtener la relación del número de microglia reactiva con respecto a la microglia en reposo en el GD, el ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $F_{(2,15)} = 27.57863$ ,  $p<0.001$ ). Aunado a ello, de manera similar a los resultados obtenidos para CA2-CA3, la prueba Bonferroni mostró que la relación microglia activa / microglia en reposo aumenta en los grupos DIA ( $4.53664 \pm 0.33309$ ;  $n=6$ ;  $p<0.001$ ) y FFR ( $4.50768 \pm 0.58937$ ;  $n=6$ ;  $p<0.001$ ) respecto al control ( $0.92336 \pm 0.10645$ ;  $n=6$ ); siendo este aumento de un 391% y un 388% respectivamente (Fig.26). Tras el análisis estadístico de estos resultados se determinó que la anorexia aumenta la relación microglia activa / microglia en reposo en el GD bajo el modelo de AID.



**Fig. 26. Densidad de microglia activa y en reposo en el giro dentado. A:** Se muestran microfotografías



representativas por grupo experimental donde se aprecian células Iba1+ en el GD con diferentes morfologías. Se distingue un mayor número de microglia activa (con cuerpo celular pleomórfico y procesos celulares acortados) en el grupo DIA y FFR que en el grupo control. **B:** Resultados obtenidos tras realizar los conteos de microglia activa y en reposo en el GD, donde se observó un aumento significativo en la relación microglia activa / microglia en reposo en el grupo DIA y FFR con respecto al control. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$  vs control;  $n = 6$ .

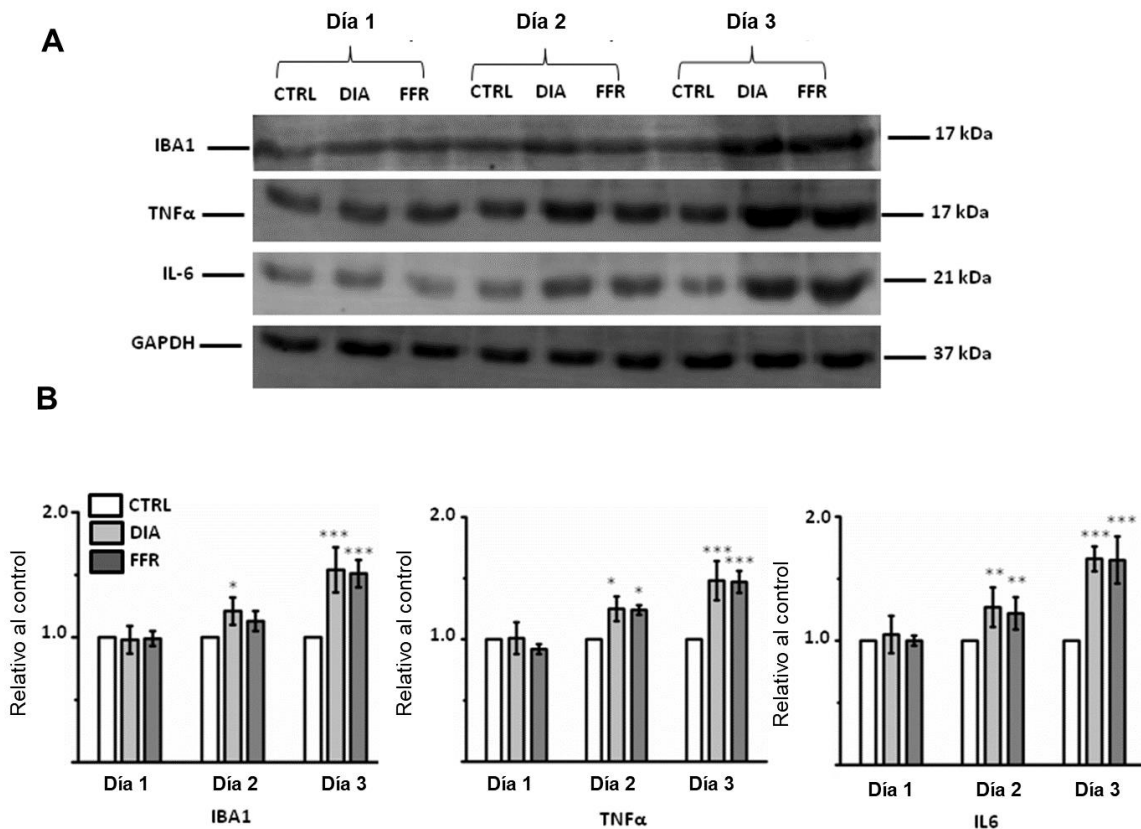
Así pues, en resumen, tras analizar los efectos de la AID en la morfología de la microglia del hipocampo se demostró que de las tres regiones analizadas (CA1, CA2-CA3 y GD), únicamente hay efectos debidos a la anorexia en CA2-CA3 y GD, donde la relación microglia activa / microglia en reposo aumenta. No se encontraron cambios en CA1.

#### **7.4 LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN AUMENTA LA EXPRESIÓN DE IBA-1, IL-6 Y TNF-ALFA EN EL HIPOCAMPO**

Se midió la expresión de Iba-1 y las citocinas pro-inflamatorias IL-6 Y TNF- $\alpha$  en los grupos experimentales con la finalidad de evaluar el efecto de la AID sobre los niveles de expresión de dichas proteínas durante diferentes ventanas del protocolo experimental, haciendo mediciones al día 1, 3 y 5. Tras lo anterior, se observó que la expresión de Iba-1 no fue afectada después de un día para DIA ( $0.98 \pm 0.11$ ;  $n = 3$ ) y FFR ( $0.99 \pm 0.06$ ;  $n = 3$ ) en comparación con el control normalizado ( $p > 0.1$ ); sin embargo, un aumento significativo de la expresión de Iba-1 fue detectado al día tres del modelo en el grupo DIA ( $1.21 \pm 0.11$ ;  $n = 3$ ) en comparación con el control normalizado ( $p < 0.05$ ), sin cambios en la expresión de FFR ( $1.13 \pm 0.08$ ;  $n = 3$ ) respecto al grupo control. Además, al quinto día la expresión de Iba-1 se incrementó de forma significativa tanto en DIA ( $1.51 \pm 0.18$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) como en FFR ( $1.54 \pm 0.11$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) comparado con el control normalizado (Fig.27).

Un efecto similar se observó para la expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ ; donde la expresión de TNF- $\alpha$  en el primer día no mostró cambios significativos en DIA ( $1.01 \pm 0.13$ ;  $n = 3$ ) y FFR ( $0.92 \pm 0.04$ ;  $n = 3$ ) en comparación con el control normalizado ( $p > 0.1$ ). Sin embargo, al tercer y quinto día se observó una mayor expresión en DIA (día 3:  $1.25 \pm 0.1$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ; día 5:  $1.48 \pm 0.16$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) y FFR (día 3:  $1.24 \pm 0.1$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ; día 5:  $1.47 \pm 0.09$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) en comparación con el control normalizado (Fig.27).

En cuanto a las mediciones de IL-6, en el primer día no hubo cambios significativos en la expresión de IL-6 en los grupos DIA ( $1.05 \pm 0.15$ ;  $n=3$ ) y FFR ( $1.00 \pm 0.04$ ;  $n=3$ ) en comparación con el control normalizado ( $p > 0.1$ ). Sin embargo, al tercer y quinto día se observó una mayor expresión de IL-6 en DIA (día 3:  $1.37 \pm 0.16$ ;  $p < 0.01$ ;  $n=3$ ; día 5:  $1.66 \pm 0.10$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n=3$ ) y FFR (día 3:  $1.32 \pm 0.13$ ;  $p < 0.01$ ;  $n=3$ ; día 5:  $1.65 \pm 0.19$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n=3$ ) en comparación con el control normalizado (Fig.27).



**Fig. 27. Expresión de Iba-1, IL-6 y TNF-alfa en el hipocampo.** La expresión de Iba-1, IL-6 y TNF-alfa se reduce al tercer y quinto día del modelo de anorexia. GAPDH se utilizó como control interno. La banda de intensidad de DIA y FFR se normalizó con sus respectivos controles. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs control;  $n=3$

## DISCUSIÓN

La anorexia es una disminución en la ingesta de alimento, a pesar de que éste se encuentre disponible, acompañado de una dramática pérdida de peso corporal; y puede estar asociada a estados patológicos o ser un mecanismo de adaptación ante retos en la homeostasis del organismo (Watts y Salter, 2007). La AN es un tipo de anorexia patológica con gran importancia clínica debido a las altas tasas de mortalidad que presenta (Arcelus et al., 2011). Los pacientes que desarrollan este trastorno psiquiátrico y alimenticio, presentan como sintomatología representativa miedo intenso a ganar peso y una imagen corporal distorsionada (APA, 2014). A pesar de que en el modelo AID se desarrolla un tipo de anorexia adaptativa, su estudio podría ayudar a comprender mejor los mecanismos neurobiológicos implicados en la AN, ya que este modelo replica ciertas características del trastorno, como una disminución voluntaria del consumo de alimento acompañada de una dramática pérdida de peso corporal, a pesar de que el alimento se encuentra disponible (Watts, 1998, Yoshimura et al., 2014) (Fig. 6 y 7). Empleando este modelo previamente se ha explorado el efecto de la anorexia en la glia y los reportes han mostrado alteraciones en la densidad de astrocitos en el cuerpo calloso y el hipocampo (Reyes-Haro et al., 2015, Reyes-Haro et al., 2016).

Entre las funciones del hipocampo, se conoce que en particular el hipocampo ventral se encuentra involucrado en la regulación de la ansiedad (McHugh et al., 2011) y que la región septal o rosal se relaciona con procesos cognitivos como el aprendizaje. También, se sabe que el hipocampo es blanco de hormonas como la ghrelina y que en estados donde se encuentra afectada la liberación de estos péptidos, se puede afectar también al hipocampo (Hsu et al., 2015). La AN es altamente comórbida con la ansiedad (Aoki et al., 2016), lo cual hace que a menudo los pacientes manifiesten exceso de ejercicio, que se sabe tiene efectos ansiolíticos (Yates et al., 1983). Sin embargo, esto deriva en una mayor vulnerabilidad y la exacerbación de los efectos de la anorexia. En el modelo ABA se han encontrado alteraciones estructurales y funcionales del hipocampo, acompañadas de comportamientos tipo ansiedad (Chowdhury et al., 2014), por lo cual se ha sugerido que esta estructura juega un papel clave en el desarrollo de la ansiedad en anorexia. Además, otros trabajos en este modelo han reportado una reducción de la proliferación celular en el GD, lo que podría afectar primariamente la gliogénesis del hipocampo (Barbarisch, et al., 2013).

Estudios recientes han mostrado una disminución en la densidad total de astrocitos en todas las regiones del hipocampo, excepto CA1, acompañada de un aumento en la densidad de astrocitos reactivos en CA2 y GD en el modelo AID (Reyes-Haro et al., 2016), lo cual podría estar acompañado de alteraciones en la microglia, ya que se conoce que la activación del astrocito puede originarse a partir de una previa activación de la microglia (Liu et al., 2011, Liddelow et al., 2017). Los resultados del presente trabajo muestran que la densidad de microglia se altera debido a la anorexia específicamente en CA3 y GD, donde se ve incrementada (Fig. 10 y 11). Cabe señalar que la región CA3 del hipocampo ha sido relacionada con la supresión de la alimentación (Sweeney y Yang, 2015). A pesar de que para el grupo DIA la densidad de microglia también aumenta en CA1 y CA2 (Fig. 8 y 9), esto no se refleja en el grupo FFR, lo que sugiere que los efectos encontrados en estas regiones se deben a la deshidratación del modelo. Además, esto se ve acompañado por un incremento de la densidad de microglia reactiva en CA2 y GD debido a la anorexia (Fig. 13), que también se ve en CA3 como efecto de la deshidratación (Fig.14). Dichos aumentos en la densidad de microglia correlacionan con el aumento que se obtuvo en la expresión de Iba1 analizado por Western blot (Fig.16). A pesar de estos cambios, el número de núcleos de forma general permanece constante entre los grupos (Fig. 8-11). Nuestros resultados sugieren fuertemente que AID no altera la cantidad de células totales del hipocampo, sino que únicamente afecta su proporción; tanto en términos de densidad de astrocitos y microglía total como de glía reactiva. Es importante señalar, que se encontró la ausencia de estos efectos debidos a la anorexia en CA1 al menos para este tipo de elementos gliales.

Adicionalmente, se ha reportado una menor expresión de c-Fos en CA3 y el GD del hipocampo en ratones mutantes con anorexia (anx/anx), mientras que no se encontraron diferencias significativas en CA1 (Kim et al., 2001); lo cual estaría indicando un decremento en la actividad de las neuronas piramidales de CA3 y las células granulares del GD. Siendo éste último un nicho neurogénico en el cerebro adulto (Cameron y McKay, 2001); tanto la disminución de proliferación celular reportada por Barbarisch, et al. (2013), como esta disminución en su actividad neuronal estarían afectando la capacidad de recuperación de la función neuronal ante un daño en el hipocampo. Además, trabajos con RM han encontrado que los pacientes con AN presentan una reducción significativa del volumen total del hipocampo (Giordano et al., 2001) y algunos estudios han

correlacionado cambios en el volumen hipocampal con pérdida celular (Polli et al., 2014). Lo anterior puede repercutir en las funciones del hipocampo, donde se sabe que la AN afecta funciones cognitivas que se reflejan en problemas de memoria y aprendizaje (Witt et al., 1985). Por otra parte, hay antecedentes de que una disfunción en la microglia en donde el receptor microglial para la quimiocina neuronal fractalquina (CX3CR1) se ve comprometido, induce una disminución del número de sinapsis, lo que incide en un deterioro de la potenciación a largo plazo (LTP) y en déficits cognitivos (Rogers et al., 2011).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un aumento en los niveles de expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  a partir del día tres del modelo AID y que se acrecentó al día cinco (Fig.16). Se ha demostrado que estas moléculas, además de la IL-1 $\alpha$ , cuando son liberadas por la microglía influyen en la activación del astrocito con un fenotipo neurotóxico (Liddelow et al., 2017). Además, se conoce que estas moléculas tienen efectos anorexigénicos (González et al., 2006), por lo que el hallazgo del aumento de los niveles de expresión de estas moléculas podría estar asociado con el desarrollo de la anorexia en los animales sometidos al modelo. Por otra parte, los efectos del protocolo de AID sobre los niveles de la expresión de citocinas pro-inflamatorias podría estar asociado con los aumentos encontrados en la densidad de glía reactiva, ya que se conoce que la glía activada tiene la capacidad de secretar este tipo de moléculas (Kettenmann et al., 2013). Además, la microglía en estado activado conduce también a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tran et al., 1997); lo cual puede ocasionar estrés oxidativo, fenómeno citotóxico que induce daño celular y promueve la inflamación (Haddad, 2002). A partir de nuestros resultados, se puede sugerir que la glía activada tiene un perfil pro-inflamatorio (A1, en astrocitos y M1, en microglía) (Liddelow et al., 2017), que posiblemente esté implicado en daño neuronal a nivel del hipocampo en condiciones de anorexia. Sin embargo, valdría la pena evaluar los niveles de citocinas anti-inflamatorias para confirmar dicha hipótesis. Si lo anterior resultara cierto, abriría la puerta a una rama de investigación donde la glía en estado activado puede ser un blanco terapéutico para combatir la anorexia patológica. Por otra parte la glía reactiva puede ser responsable de la disminución de la ramificación de las dendritas del hipocampo informadas en el modelo ABA (Chowdhury et al., 2014), que tiene importantes consecuencias sobre la plasticidad sináptica del hipocampo que aún deben explorarse. Aunado a lo anterior, encontramos que el protocolo de AID contribuye a la neurodegeneración de

GD principalmente (Apéndice A4).

De manera interesante, TNF- $\alpha$  e IL-6 han sido implicados en la inhibición de la alimentación (Kapás y Krueger, 1992; Fantino y Wieteska, 1993; Plata-Salaman et al., 1996; Sonti et al., 1996). Además, algunos estudios han demostrado que la expresión de ARNm de TNF $\alpha$  e IL6 se encuentra elevada en muestras de suero de pacientes anoréxicos (Pomeroy et al., 1994; Raymond et al., 2000, Kahl et al., 2004); y que la anorexia mediada por citocinas, se desencadena por la activación de microglia en el núcleo arqueado hipotalámico (Jin et al., 2016). Estas citocinas se han asociado previamente a una alimentación reducida y a la anorexia que actúa principalmente en los centros hipotalámicos (Vaisman y Hahn, 1991; Kapás y Krueger, 1992; Kent y cols., 1992; Fantino y Wieteska, 1993; Plata-Salaman, 1996; Sonti et al. al., 1996; Yao et al., 1999). Sin embargo, ahora demostramos que también se expresan localmente en el hipocampo de ratas hembras jóvenes bajo el protocolo de anorexia, y este perfil inflamatorio podría ser un elemento adicional implicado en la supresión de la alimentación (Sweeney y Yang, 2015). Sin embargo, pocos estudios han vinculado la microglia como un promotor de la inflamación cerebral con anorexia (Jin et al., 2016), a pesar de que este tipo de glía es uno de los principales productores de citocinas en el cerebro.

Aunque la neuroinflamación se reconoce cada vez más como un sello distintivo de varios trastornos psiquiátricos (Solmi et al., 2015 para revisión), se ha prestado menos atención a los procesos pro-citocina inflamatorios que en la AN podrían afectar diferentes áreas del cerebro, incluyendo el hipotálamo y las estructuras límbicas. Los núcleos arqueado y dorsomedial del hipotálamo son blanco de las citocinas periféricas y están involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos, mientras que otras áreas del cerebro, como el hipocampo, están relacionadas con la regulación de la función emocional y cognitiva. El hipocampo se ha relacionado recientemente con el comportamiento alimentario mediante la regulación de aspectos aprendidos o motivacionales de la ingesta de alimentos mediante la acción de hormonas endocrinas involucradas en el apetito (Irving y Harvey, 2014; Hsu et al., 2015; Sweeney y Yang, 2015).

Cabe señalar que se utilizaron métodos morfológicos para diferenciar entre microglía activada y en reposo, donde el tamaño del soma y los procesos fueron los parámetros que se consideraron para dichos conteos (VanGuilder et al., 2011). Sin embargo, el uso de marcadores específicos para cada

estadio de este tipo de elemento glial podría ayudar a tener información más certera. Diversos marcadores pueden ser usados para distinguir la microglia activada e incluso para distinguir su fenotipo particular; ya sea M1 que tiene un perfil pro-inflamatorio o M2 con perfil anti-inflamatorio. Para el primer caso puede emplearse CD68, CD86 o CD16/32 por mencionar algunos ejemplos, y para el segundo puede utilizarse CD206 (Zhou et al., 2017). Además, recientemente se han desarrollado técnicas con RM y tomografía por emisión de positrones (PET) que permiten obtener imágenes donde se marca la microglía activada (Tronel et al., 2017). Debido a las limitaciones que tiene el hacer estudios histológicos en pacientes anoréxicos, estas técnicas ofrecen una alternativa para el estudio de la microglía en el cerebro de pacientes con AN.

Así pues, los datos actuales demuestran que el hipocampo emerge como una estructura sensible a la anorexia, afectada por un entorno pro-inflamatorio producido por la glía reactiva. La liberación de citocinas por microglia puede traer consigo deficiencias conductuales y cognitivas (Henry et al., 2008; Verica y Schmidt, 2017). Debido a que el hipocampo es parte del sistema límbico y participa en las respuestas emocionales, la neurogénesis adulta, la neuroplasticidad y la función cognitiva, una mejor comprensión de los efectos de la anorexia en esta área del cerebro podría ser fundamental para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos, dirigidos a controlar la neuroinflamación y preservar las funciones tanto cognitivas como emocionales.

## **CONCLUSIONES**

-El modelo experimental de anorexia AID replica ciertas características de la AN como una disminución en la ingesta de alimentos acompañada de una acelerada pérdida de peso corporal, donde la reducción de la ingesta es voluntaria.

-La anorexia en el modelo AID produce alteraciones en todas las regiones del hipocampo, excepto en CA1, aumentando la densidad de microglia total en CA3 y el giro dentado del hipocampo de rata y la densidad de microglia reactiva en CA2.

- El modelo AID no altera la cantidad de células totales del hipocampo, sino que únicamente afecta

su proporción

- El modelo AID aumenta la expresión de Iba-1 y las citocinas pro-inflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$  en el hipocampo de rata.

-El aumento de glía reactiva en el hipocampo en el modelo AID correlaciona con el aumento visto en las moléculas pro-inflamatorias, y podría estar teniendo un efecto citotóxico, afectando las funciones del hipocampo.

## REFERENCIAS

1. Alzheimer, A. 1910. Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihre Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe. In: Nissl, FA., Alzheimer, A., editors. Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde. Jena: Gustav Fischer Verlag.
2. American Psychiatric Association (APA). 2014. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed Washington, DC: American Psychiatric Association; text revision.
3. Andersen, P. 2007. The Hippocampus Book. New York: Oxford University Press.
4. Aoki, C., Chowdhury, T., Wable, G., Chen, Y. 2016. Synaptic Changes in the Hippocampus of Adolescent Female Rodents Associated with Resilience to Anxiety and Suppression of Food Restriction-Evoked Hyperactivity in an Animal Model for Anorexia Nervosa. Brain Research. No.(vol),1-14.
5. Araque, A., Perea, G. 2004. Glial Modulation of Synaptic Transmission in Culture. Glia. 47 (3): 241-248
6. Arcelus, J., Mitchell, A., Wales, J., Nielsen, S. 2011. Mortality Rates in Patients with Anorexia Nervosa and Other Eating Disorders. A meta-analysis of 36 studies. Arch. Gen. Psychiatry 68, 724–731
7. Barbarich, N., Fornal, C., Takase, L., Bocarsly, M., Arner, C., Walsh, B., Hoebel, B., Jacobs, B. 2013. Activity-Based Anorexia is Associated with Reduced Hippocampal Cell Proliferation in Adolescent Female Rats. Behavioural Brain Research. 236 (1):



8. Belmonte, L., Achamrah, N., Nobis, S., Guérin, C., Riou, G., Bôle-Feysot, C., Coëffier, M., et al., 2016. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Sci. Rep.* 6, 35813
9. Bergles, D. E., R. Jabs y C. Steinhauser. 2010. Neuron-Glia Synapses in the Brain. *Brain research reviews.* 63: 130-137
10. Beumont, P., Arthur, B., Russell, J., Touyz, S. 1994. Excessive Physical Activity in Dieting Disorder Patients: Proposals for a Supervised Exercise Program. *Int. J. Eat. Disord.* 15:1, 21–36.
11. Boraska, V., Franklin, C. S., Floyd, J. A. B., Thornton, L. M., Huckins, L. M., Southam, L., ... Bulik, C. M. 2014. A Genome-Wide Association Study of Anorexia Nervosa. *Molecular Psychiatry.* 19(10): 1085-1094
12. Boyle CN et al (2012) Dehydration-anorexia derives from a reduction in meal size, but not meal number. *Physiol Behav.* 105(2):305–314
13. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254
14. Broberger C, Johansen J, Schalling M, Hökfelt T (1997) Hypothalamic neurohistochemistry of the murine anorexia (anx/anx) mutation: Altered processing of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 387:124–135.
15. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15043–15048
16. Broberger C, et al. (1999) Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia (anx/anx) mouse hypothalamus. *J Neurosci* 19:7130–7139.
17. Bulik, C., Landt, M., Furth, E., Sullivan, P. 2007. The Genetics of Anorexia Nervosa. *Anu. Rev. Nutr.* 27: 263-275
18. Cabrera, V., Ramos, E., González-Arenas, A., Cerbón, M., Camacho-Arroyo, I., Morales, T. 2013. Lactation reduces glial activation induced by excitotoxicity in the rat hippocampus. *J Neuroendocrinol.* 25 (6): 519–527

19. Cameron, H., McKay R. 2001. Adult Neurogenesis Produces a Large Pool of New Granule Cells in the Dentate Gyrus. *J Comp Neurol.* 435 (4): 406-417
20. Casper, R.C., Sullivan, E.L., Tecott, L., 2008. Relevance of Animal Models to Human Eating Disorders And Obesity. *Psychopharmacology.* 199: 313–329
21. Cenquizca, L., Swanson, L. 2007. Spatial Organization of Direct Hippocampal Field CA1 Axonal Projections to the Rest of Cerebral Cortex. *Brain Res Rev.* 56 (1): 1-26
22. Chaudhri, O., Small, C., Bloom, S. 2006. Gastrointestinal Hormones Regulating Appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361 (1471): 1187-1209
23. Chowdhury, T., Ríos, M., Chan, T., Cassataro, D., Barbarich-Marsteller, N., Aoki, C. 2014. Activity-Based Anorexia During Adolescence Disrupts Normal Development of the CA1 Pyramidal Cells in the Ventral Hippocampus of Female Rats. *Hippocampus.* 24 (12): 1421-1429
24. Cooper, M. 2005. Cognitive theory in anorexia nervosa and bulimia nervosa: progress, development and future directions. *Clin Psychol Rev.* 25 (4):511–531
25. De Gortari, P. 2009. La Regulación de la Conducta Alimentaria en un Modelo Experimental de Anorexia. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas.* 14 (4): 185-190
26. De Gortari, P., Mancera, K., Cote-Velezetal, A. 2009. Involvement of CRH-R2 Receptor in Eating Behavior and in the Response of the HPT Axis In Rats Subjected to Dehydration-Induced Anorexia. *Psychoneuroendocrinology.* 34 (2): 259–272.
27. du Percie Sert N et al. 2011. Cisplatin-induced emesis: systematic review and meta-analysis of the ferret model and the effects of 5-HT(3) receptor antagonists. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67 (3):667–686
28. Fitzsimons JT and LeMagnen J. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 67: 273–283, 1969.
29. Freeman, M. 2010. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science.* 330 (6005): 774-778
30. Frintrop, L., Trinh, S., Liesbrock, J., Paulukat, L., Kas, M., Tolba, R., Konrad, K., Herpertz-Dahlmann, B., Beyer, C., Seitz, J. 2017. Establishment of a Chronic Activity-Based Anorexia Rat Model. *J Neurosci Methods.* 29 (293): 191-198
31. García, C., Fuente, E., Argente, J., Chowen, J. 2012. Emerging Role of Glial Cells in

- the Control of Body Weight. *Molecular Metabolism*. 1 (1): 37-46
32. Gasser, U., Hatten, M. 1990. Neuron-Glia Interactions of Rat Hippocampal Cells *in vitro*: Glial-Guided Neuronal Migration and Neuronal Regulation of Glial Differentiation. *The Journal of Neuroscience*. 10 (4): 1276-1285
  33. Giordano, G., Renzetti, P., Parodi, R., Foppiani, L., Zandrino, F., Giordano, G., Sardanelli, F. 2001. Volume Measurement with Magnetic Resonance Imaging of Hippocampus-Amygdala Formation in Patients with Anorexia Nervosa. *Journal of Endocrinological Investigation*. 24 (7): 510–514
  34. González, M., Ambrosio, K., Sánchez, S. 2006. Regulación Neuroendócrina del Hambre, la Saciedad y Mantenimiento del Balance Energético. *Investigación en Salud*. 8 (3): 191-200
  35. Gull, W. 1997. Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica). 1868. *Obes Res*. 5 (5):498–502
  36. Gutman Y and Kraus M. Regulation of food and water intake in rats as related to plasma osmolarity and volume. *Physiol Behav* 4: 311–313, 1968
  37. Haddad, J. 2002. Oxygen-sensitive pro-inflammatory cytokines, apoptosis signaling and redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Cytokines Cell Mol Ther*. 7:1–14.
  38. Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. 2007. Microglia: Active Sensor and Versatile Effector Cells in the Normal and Pathologic Brain. *Nat. Neurosci*. 10: 1387– 1394
  39. Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S., Rusakov, D. 2010. Long-Term Potentiation Depends on Release of D-Serine from Astrocytes. *Nature*. 463 (7278): 232-236
  40. Hsu, T., Hahn, J., Konanur, V., Noble, E., Suarez, A., Thai, J., Nakamoto, E., Kanoski, S. 2015. Hippocampus Ghrelin Signaling Mediates Appetite Through Lateral Hypothalamic Orexin Pahtways. *eLife Sciences*. 4: 1-20
  41. Huang W, Sved AF, and Stricker EM. Water ingestion provides an early signal inhibiting osmotically stimulated vasopressin secretion in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R756–R760, 2000.
  42. Iglesias-Rozas, JR., Garrosa, M. 2013. Río-Hortega's third contribution to the morphological knowledge and functional interpretation of the oligodendroglia. Amsterdam: Elsevier.

43. Jahng JW, Houpt TA, Kim SJ, Joh TH, Son JH (1998) Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res* 790: 67–73.
44. Jaimes, L., Joseph, P., De Gortari, P. 2008. Differential Response of TRHergic Neurons of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus (PVN) in Female Animals Submitted to Food-Restriction or Dehydration-Induced Anorexia and Cold Exposure. *Hormones and Behavior*. 53: 366-377
45. Jiménez, J. 2005. *Lecciones de Neuroanatomía Clínica*, España: Universidad de Sevilla. Johansen JE, et al. (2000) Hypothalamic CART and serum leptin levels are reduced in the anorectic (anx/anx) mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 84:97–105.
46. Johansen JE, et al. (2001) Altered dopaminergic transmission in the anorexic anx/anx mouse striatum. *Neuroreport* 12:2737–2741
47. Kasese-Hara M, Wright C, Drewett R (2002) Energy compensation in young children who fail to thrive. *J Child Psychol Psychiatry* 43:449–456.
48. Kaye W (2008) Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol Behav* 94: 121–135.
49. Ketinó, D. 2013. *Sistema Inducible para Marcado de Neuronas Activadas Durante el Aprendizaje de una Tarea Conductual*, México: UNAM.
50. Kettenmann, H., Kirchhoff y A. Verkhratsky. 2013. Microglía: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*. 77: 10-18.
51. Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. 2011. Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* 91: 461–553.
52. Kim, S., Choi, Y., Park, H. 2001. Decrease of c-Fos Expression in Hippocampus of Anorexia (anx/anx) Mice. *Korean Journal of Biological Sciences*. 5 (2): 157-161
53. Kissileff HR. Food-associated drinking in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 67: 284–300, 1969
54. Kocsis, F., Klein, W., Altmann, H. 1973. A screening system to determine inhibition of specific enzymes of the semiconservative DNA-synthesis and DNA-repair replication (author's transl). *Z Naturforsch C*. 28 (3):131–135
55. Kraly FS, Katz JB, Burchard AE, Case C, Gabriel VA, Lanz TA, Mikkelsen ME, and Sokol MB. H2 histaminergic control of inhibition of eating induced by intragastric NaCl

- in rats. *Physiol Behav* 65: 105–113, 1998
56. Kreutzberg, G., 1996. Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS. *Trends in Neurosciences*. 19 (8): 312-218
  57. Lafrance, V., Inoue, W., Luhenshi, G. 2010. Leptin Modulates Cell Morphology and Cytokine Release in Microglia. *Brain Behav Immun*. 24 (3): 358-365
  58. Lee, T.-J., Kinzig, K.P. 2017. Repeated adolescent activity-based anorexia influences central estrogen signaling and adulthood anxiety-like behaviors in rats. *Physiol. Behav.* 171, 199–206
  59. Liddelow, S., Guttenplan, K., Clarke, L., Bennett, F., Bohlen, C., Schirmer, L., Bennett, M., Münch, A., Chung, W., Peterson, T., Wilton, D., Frouin, A., Napier, B., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M., Rowitch, D., Dawson, V., Dawson, T., Stevens, B., Barres, B. 2017. Neurotoxic Reactive Astrocytes are Induced by Activated Microglia. *Springer Nature*. 541 (7638): 481-487
  60. Liu W., Tang, Y., Feng, J. 2011. Cross Talk Between Activation of Microglia and Astrocytes in Pathological Conditions in the Central Nervous System. *Life Sci*. 89: 141-146
  61. Lizarbe, B., Cerdán, S. 2013. Control Hipotalámico de las Interacciones Neuroendocrinas. *An Real Acad. Farm*. 79 (1): 90-110
  62. Maltais LJ, Lane PW, Beamer WG. 1984. Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *J Hered* 75:468–472.
  63. McHugh, S., Fillenz, M., Lowry, J., Rawlins, N., Bannerman, D. 2011. Brain Tissue Oxygen Amperometry in Behaving Rats Demonstrates Functional Dissociation of Dorsal and Ventral Hippocampus During Spatial Processing and Anxiety. *European Journal of Neuroscience*. 33: 322-337
  64. Mrosovsky, N., Sherry, D. 1980. Animal Anorexias. *Science*. 207 (4433): 837-842
  65. Nilsson I, Lindfors C, Fetissov SO, Hökfelt T, Johansen JE (2008) Aberrant agoutirelated protein system in the hypothalamus of the anx/anx mouse is associated with activation of microglia. *J Comp Neurol* 507:1128–1140.
  66. Nissl, F. 1904. Zur Histopathologie der paralytischen Rindenerkrankungen. Jena: Fischer. 315-494.
  67. Pan, W., Hsuchou, H., Jayaram, B., Khan, R., Huang, E., Wu, X., Chen, C., Kastin, A.

2012. Leptin Action on Nonneuronal Cells in the CNS: Potential Clinical Applications. *Ann N Y Acad Sci.* 1264 (1): 64-71
68. Pinheiro A, Thornton L, Plotoncov K, Tozzi T, Klump K, et al. 2007. Patterns of Menstrual Disturbance in Eating Disorders. *Int. J. Eat. Disord.* In press
69. Reyes, D. 2014. La Glía, el Pegamento de las Ideas. *Ciencia.* 12-18
70. Reyes, D., Labrada, E., Miledi, R., Martínez, A. 2015. Dehydration-Induced Anorexia Reduces Astrocyte Density in the Rat Corpus Callosum. *NeuralPlasticity*, 2015: 1-8
71. Reyes, D., Labrada, F., Varman, R., Krüger, J., Morales, T., Miledi, R., Martínez, A. 2016. Anorexia Reduces GFAP+ Cell Density in the Rat Hippocampus. *Neural Plasticity.* 1-11
72. Paré, W.P. 1977. Body temperature and the activity-stress ulcer in the rat. *Physiol. Behav.* 18 (2): 219–223
73. Paulukat, L., Frintrop, L., Liesbrock, J., Heussen, N., Johann, S., Exner, C., Seitz, J., et al. 2016. Memory impairment is associated with the loss of regular oestrous cycle and plasma oestradiol levels in an activity-based anorexia animal model. *World J. Biol. Psychiatry*, 1–11
74. Polli, R., Malheiros, J., Dos Santos, R., Hamani, C., Longo, B., Tannús, A., Mello, L., Covolan, L. 2014. Changes in Hippocampal Volume are Correlated with Cell Loss but Not with Seizure Frequency in Two Chronic Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol.* 5 (111): 1-11
75. Ramón y Cajal, S. 1913. Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol Univer Madrid.* XI: 215-315
76. Rinaman L et al (2005) Dehydration anorexia is attenuated in oxytocin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(6):R1791–R1799
77. Rogers, J., Morganti, J., Bachstetter, A., Hudson, C., Peters, M., Grimmig, B., et al. 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 31, 16241–16250
78. Rolls BJ and McFarland DJ. Hydration releases inhibition of feeding produced by intracranial angiotensin. *Physiol Behav* 11: 881–884, 1973
79. Rolls, E. 2006. Brain Mechanisms Underlying Flavour and Appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361: 1123-1136

80. Rouach, N., Giaume, C. 2001. Connexins and GAP Junctional Communication in Astrocytes are Targets for Neuroglial Interaction. *Prog Brain Res.* 132: 203-214
81. Sanz, J., Rivera, F., López, J., López, C., López, A., Vega, M. 2004. El Síndrome Anorexia Caquexia. *Psicooncología.* 1 (2-3): 101-106
82. Schoorlemmer GH, Evered MD (2002) Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5):R1061–R1069
83. Schwartz M., Woods S., Porte D., Seeley R., Baskin, D. 2000. Central Nervous System Control of Food Intake. *Nature.* 404:661-671
84. Senn M, Gross-Lüem S, Kaufmann A, and Langhans W. Effect of water deprivation on eating patterns of lactating cows fed grass and corn pellets ad lib. *Physiol Behav* 60: 1413–1418, 1996.
85. Steiger Burgos M, Langhans W, and Senn M. Role of rumen fluid hypertonicity in the dehydration-induced hypophagia of cows. *Physiol Behav* 71: 423–430, 2000.
86. Siegfried, Z., Berry, E., Hao, S., Avraham, Y. 2003 Animal Models in the Investigation of Anorexia. *Physiol Behav* 79:39–45
87. Smink, F., Hoeken, D., Oldehinkel, A., Hoek, H. 2014. Prevalence and Severity of DSM-5 Disorders in a Community Cohort of Adolescents. *Int. J. Eat. Disord.* 47: 610-619
88. Stellar, E. 1954. The Physiology of Motivation. *Psychological Review.* 61 (1): 5-22
89. Sullivan, P.F., 1995. Mortality in anorexia nervosa. *Am. J. Psychiatry* 152, 1073–1074.
90. Tannenholz, L., Jiménez, J., Kheirbek, M. 2014. Local and Regional Heterogeneity Underlying Hippocampal Modulation of Cognition and Mood. *Front Behav Neurosci.* 8 (147): 1-7
91. Tran, E., Hardin-Pouzet, H., Verge, G., Owens, T. 1997. Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 74:121–9
92. Tronel, C., Largeau, B., Ribeiro, M., Guilloteau, D., Dupont, A., Arlicot, N. 2017. Molecular Targets for PET Imaging of Activated Microglia: The Current Situation and Future Expectations. *Int J Mol Sci.* 18 (4): 802
93. Vance WB. Observations on the role of salivary secretions in the regulation of food and

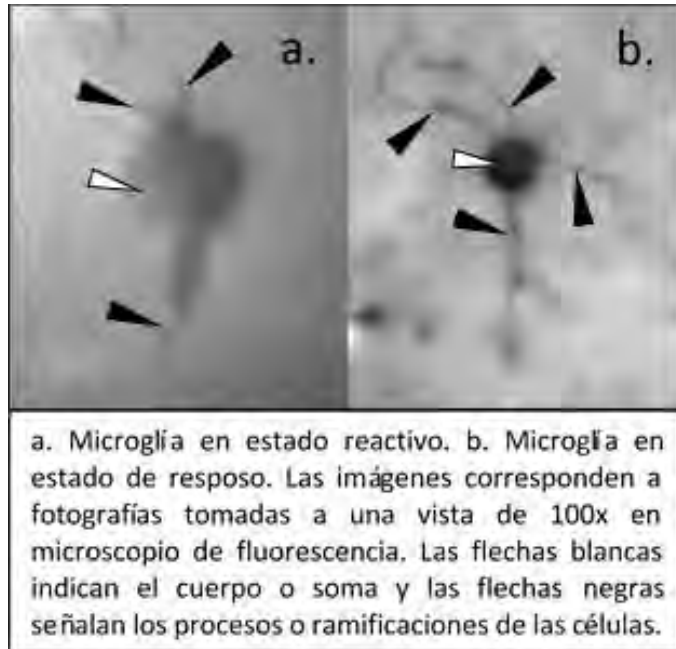
- fluid intake in the white rat. *Psychol Monogr* 79: 1–22, 1965
94. VanGuilder et al., 2011; J Neuroinflammation: Concurrent hippocampal induction of MHCII pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment
  95. Vanoye, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza, A., Cerbón, M. 2008. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm Behav.* 53(1): 112-123
  96. Verhagen, J. 2007. The Neurocognitive Bases of Human Multimodal Food Perception: Consciousness. *Brain Res Rev.* 53 (2): 271-286
  97. Volterra, A., Meldolesi, J. 2005. Astrocytes, from Brain Glue to Communication Elements: The Revolution Continues. *Nature Reviews Neuroscience.* 6: 626-640
  98. Volterra, A., Steinhäuser, C. 2004. Glial Modulation of Synaptic Transmission in the Hippocampus. *Glia.* 47: 249-257
  99. Watanabe, K., Hara, C., Ogawa, N. 1992. Feeding conditions and estrous cycle of female rats under the activity-stress procedure from aspects of anorexia nervosa. *Physiol. Behav.* 51 (4): 827–832.
  100. Watts, A. 1998. Dehydration-Associated Anorexia: Development and Rapid Reversal. *Physiology and Behavior.* 65: 871-878.
  101. Watts, A. 2001. Neuropeptides and the Integration of Motor Responses to Dehydration. *Annu Rev Neurosci* 24:357–384
  102. Watts, A., Boyle, C. 2010. The Functional Architecture of Dehydration-Anorexia. *Physiology and Behavior.* 100 (5): 472-477
  103. Watts, A., Kelly, A., Sanchez-Watts, G. 1995. Neuropeptides and Thirst: The Temporal Response of Corticotropin-Releasing Hormone and Neurotensin/Neuromedin N Gene Expression in Rat Limbic Forebrain Neurons to Drinking Hypertonic Saline. *Behav Neurosci* 109(6):1146–1157
  104. Watts, A., Salter, D. 2004. Neurobiology of Food and Fluid Intake. 2<sup>nd</sup> Ed. Vol. 14 of Handbook of Behavioral Neurobiology. Plenum Publishers. New York. P.383-384
  105. Watts, A., Salter, D. 2007. Neural Network Interactions and Ingestive Behavior Control During Anorexia. *Physiol Behav.* 91 (4): 389-396
  106. Watts, A., Sanchez-Watts, G., Kelly, A. 1999. Distinct Patterns of Neuropeptide



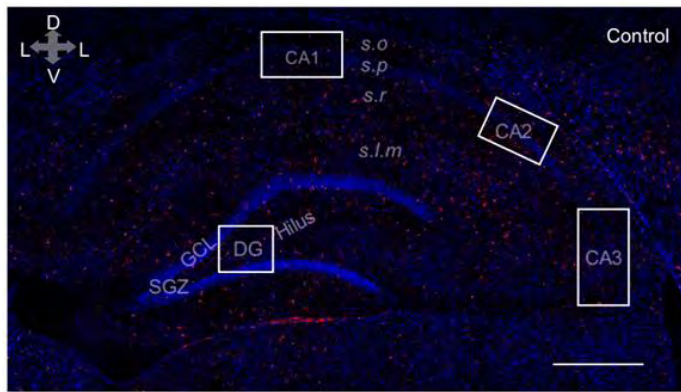
- Gene Expression in the Lateral Hypothalamic Area and Arcuate Nucleus are Associated with Dehydration-Induced Anorexia. *J Neurosci* 19(14):6111–6121
107. Winsor AL. The effect of dehydration on parotid secretion. *Am J Psychol* 42: 602–607, 1930.
108. Witt, E., Ryan, C., Hsu, L., George, M. 1985. Learning Deficits in Adolescents with Anorexia Nervosa. *The Journal of Nervous and Mental Disease*.
109. Wolf, S., Boddeke, H., Kettenmann, H. 2017. Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*. 79: 19.1-19.25
110. Woods, S., Lotter, E., McKay, L. & Porte, D. J. 1979. Chronic Intracerebroventricular Infusion of Insulin Reduces Food Intake and Body Weight of Baboons. *Nature*. 282: 503–505
111. Yakabi K et al. 2010. Reduced ghrelin secretion in the hypothalamus of rats due to cisplatin-induced anorexia. *Endocrinology* 151 (8):3773–3782
112. Yates A, Leehey K, Shisslak CM. 1983. Running--an analogue of anorexia? *N Engl J Med*. 308(5): 251–5
113. Yin TH and Tsai CT. Effects of glucose on feeding in relation to routes of entry in rats. *J Comp Physiol Psychol* 85: 258–264, 1973.
114. Yoshimura, M., Matsuura, T., Ohkubo, J., Maruyama, T., Ishikura, T., Hashimoto, H., Kakuma, T., Mori, M., Ueta, Y. 2014. A Role Of Nesfatin-1/Nucb2 In Dehydration-Induced Anorexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 307(2):225–236
115. Yoshimura, M., Uezono, Y., Yoichi, U. 2015. Anorexia in Human and Experimental Animal Models: Physiological Aspects Related to Neuropeptides. *J Physiol Sci*. 65 (5): 385-395
116. Zhenzhong, C., Gerfen, C., Young, S. 2013. Hypothalamic and Other Connections with the Dorsal CA2 Area of the Mouse Hippocampus. *J Comp Neurol*. 521 (8): 1844-1866
117. Zhou, T., Huang, Z., Sun, X., Zhu, X., Zhou, L., Li, M., Cheng, B., Liu, X., He, C. 2017. Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. *Frontiers in Neuroanatomy*. 11 (77):
118. Zipfel, S., et al., 2000. Long-Term Prognosis in Anorexia Nervosa: Lessons from a 21- Year Follow-Up Study. *Lancet*. 355: 721–722.



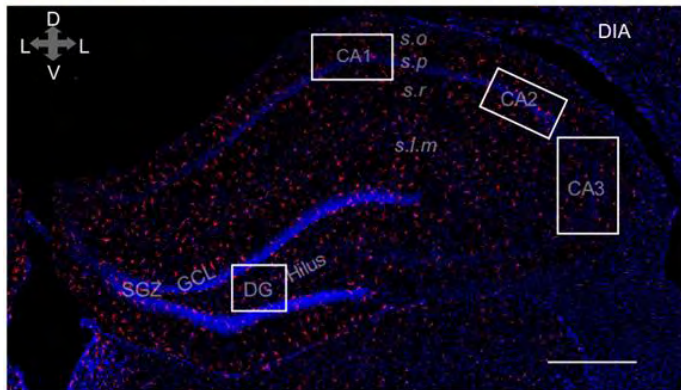
## APÉNDICES



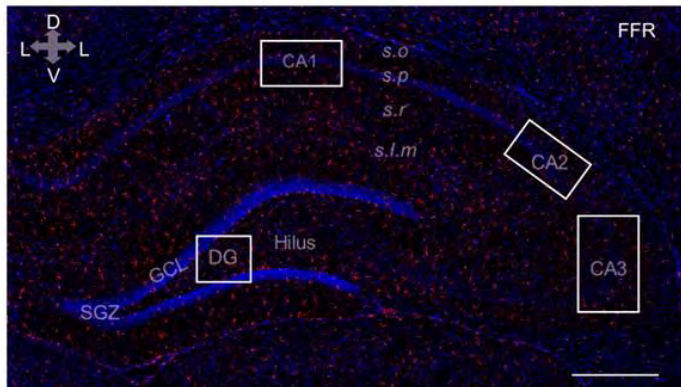
**A1. Estadíos morfológicos de la microglia. Incluye la información relevante (preparación inmunicitoquímica)**



Control



DIA

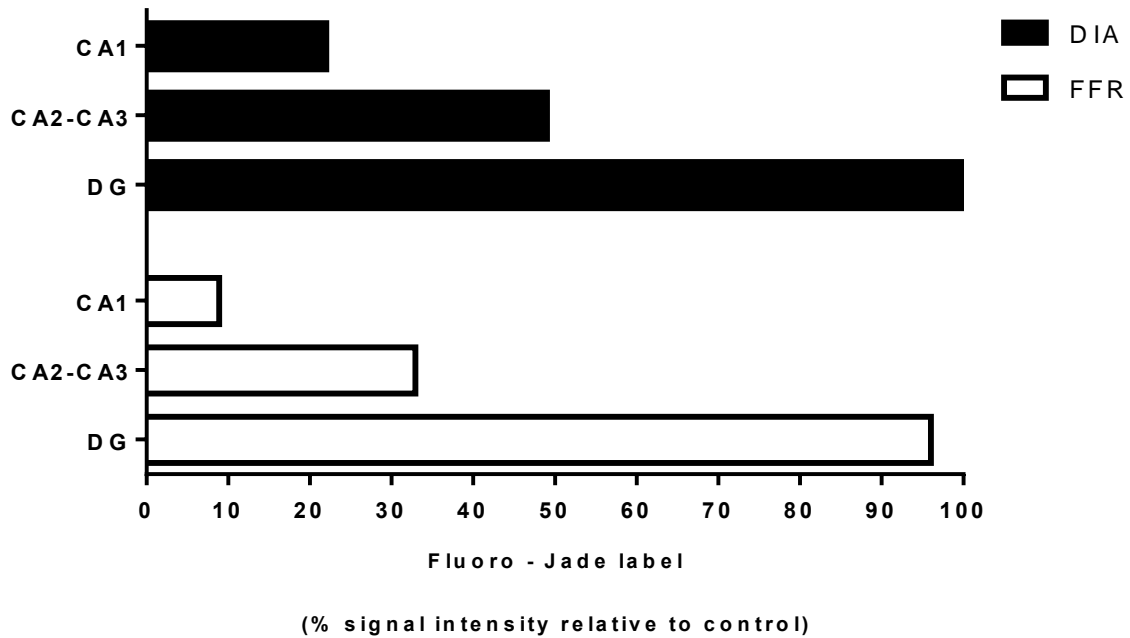


FFR

**A2. Vista panorámica de secciones coronales que muestran el hipocampo para control, DIA y FFR.**

TABLE 1: Regional changes in microglial density			
Hippocampal region	Control	DIA	FFR
Nuclei			
CA1	732.64 ± 36.43 (N=12)	757.64 ± 102.48 (N=12)	743.06 ± 100.31 (N=12)
CA2-CA3	1129.86 ± 63.90 (N=12)	1348.96 ± 60.59 (N=12)*	1116.67 ± 37.81 (N=12)
DG/SGZ	1191.76 ± 88.52 (N=12)	1312.5 ± 111.82 (N=12)	1229.17 ± 110.35 (N=12)
Microglia			
CA1	114.58 ± 11.20 (N=12)	218.75 ± 27.45 (N=12)***	111.11 ± 11.30 (N=12)
CA2-CA3	89.24 ± 7.75 (N=12)	229.86 ± 14.23 (N=12)***	117.36 ± 12.20 (N=12)
DG/SGZ	75 ± 3.01511 (N=12)	337.5 ± 51.91 (N=12)***	166.67 ± 18.80 (N=12)
Microglia/nuclei ratio			
CA1	0.1936 ± 0.0283 (N=12)	0.42927 ± 0.1028 (N=12)	0.24828 ± 0.0550 (N=12)
CA2-CA3	0.09311 ± 0.0098 (N=12)	0.1875 ± 0.01037 (N=12)***	0.11664 ± 0.0166 (N=12)
DG/SGZ	0.06755 ± 0.00722 (N=12)	0.25824 ± 0.02945 (N=12)***	0.13477 ± 0.01017 (N=12)*
Activated microglia			
CA1	50.9014 ± 5.0791 (N=6)	96.50296 ± 10.5994 (N=6)*	69.08172 ± 10.9996 (N=6)
CA2-CA3	48.48518 ± 5.7941 (N=6)	135.91519 ± 12.88004 (N=6)***	79.31998 ± 8.5627 (N=6)
DG/SGZ	31.86473 ± 2.89959 (N=6)	170.36939 ± 21.48829 (N=6)***	79.85803 ± 14.4087 (N=6)
Resting microglia			
CA1	61.30809 ± 8.7438 (N=6)	64.02655 ± 9.0074 (N=6)	34.45696 ± 6.4152 (N=6)
CA2-CA3	72.93777 ± 9.69547 (N=6)	66.38852 ± 3.92209 (N=6)	36.64073 ± 5.42913 (N=6)*
DG/SGZ	37.06722 ± 5.1281 (N=6)	49.30611 ± 7.9445 (N=6)	19.86444 ± 2.35011 (N=6)
Activated microglia/resting microglia ratio			
CA1	0.99691 ± 0.1342 (N=6)	1.66845 ± 0.3057 (N=6)	1.60229 ± 0.2557 (N=6)
CA2-CA3	0.76674 ± 0.09329 (N=6)	2.50632 ± 0.26561 (N=6)**	2.74269 ± 0.40804 (N=6)***
DG/SGZ	0.92336 ± 0.10645 (N=6)	4.53664 ± 0.33309 (N=6)***	4.50768 ± 0.58937 (N=6)***

### A3. Cambios en densidad de microglia por región del hipocampo



**A4. Intensidad de señal de fluoro jade C relativa al control.** Se estimó la neurodegeneración en el hipocampo bajo el modelo de AID a través de mediciones de intensidad de señal de fluorojade C donde se encontró un mayor efecto en el GD del hipocampo, siendo hasta casi un 100% mayor al control dicha intensidad de señal.