



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

LA ANOREXIA INDUCE UN AMBIENTE PROINFLAMATORIO ASOCIADO A LA
MICROGLÍA Y NEURODEGENERACIÓN EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
MNH PAMELA REYES ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS
DR. DANIEL REYES HARO
COMITÉ TUTOR
DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

QUERÉTARO

MAYO, 2021



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.

AGRADECIMIENTOS

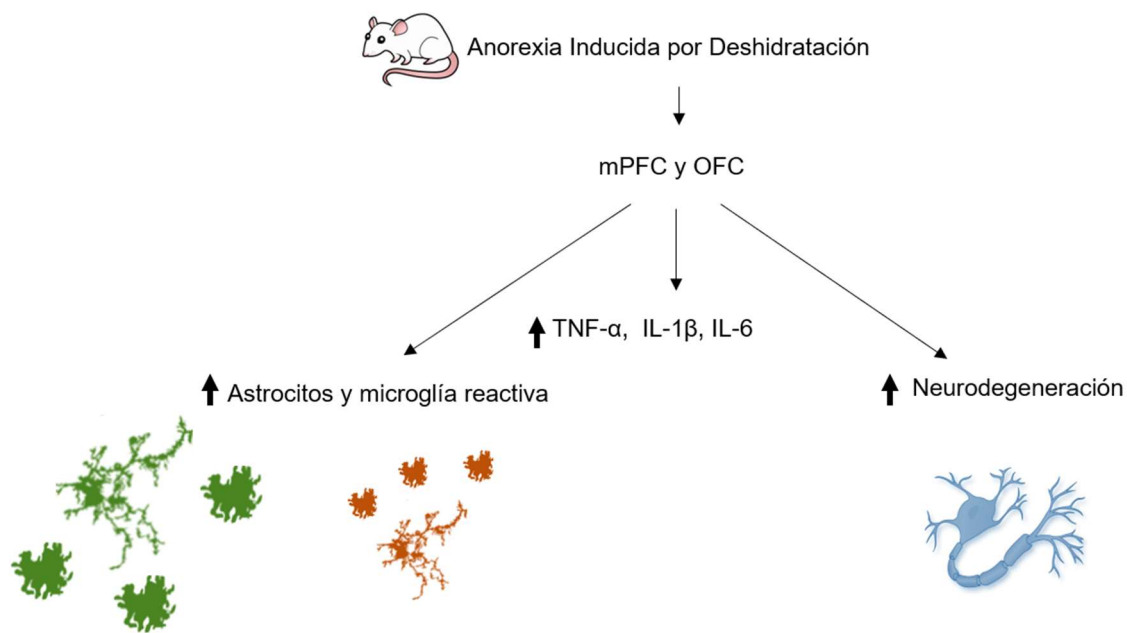
A la UNAM y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, a CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de la tesis (554231) y al apoyo del PAPIIT-UNAM (IN201915 y IN205718).

A todos los que participaron directa o indirectamente en la realización de esta tesis.

RESUMEN

El término anorexia describe la pérdida de apetito y la reducción concomitante en la ingesta de alimentos. La corteza prefrontal (PFC) integra entradas sensoriales y participa en el aprendizaje asociativo para promover (hambre) o inhibir (saciedad) el comportamiento de búsqueda de alimentos. El objetivo de este trabajo fue investigar si la anorexia está asociada a un ambiente proinflamatorio y neurodegeneración en la corteza prefrontal medial (mPFC) y la corteza orbitofrontal (OFC), regiones específicas de la PFC involucradas en la recompensa a la ingesta de alimentos. Nuestros resultados mostraron que la anorexia inducida por deshidratación (DIA) incrementó la expresión de IBA-1 (+82%), vimentina (+88%) y nestina (+84%), sin embargo, redujo la expresión de GFAP (-48%). Así mismo, DIA promovió la morfología de-ramificada de la microglía y los astrocitos, aumentando con ello la relación microglía de-ramificada/ramificada (mPFC +2515% y OFC +2540%) y de astrocitos de-ramificados/ramificados (mPFC +1003% y OFC 661%). Además, se observó el incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α (+98%), IL-6 (+85%) e IL-1 β (+70%). Finalmente, los estudios de doble inmunofluorescencia (Fluorojade-NeuN) mostraron neurodegeneración en mPFC (+21%) y en OFC (+30%). Conclusión: DIA promovió un ambiente neuroinflamatorio y neurodegeneración en mPFC y OFC.

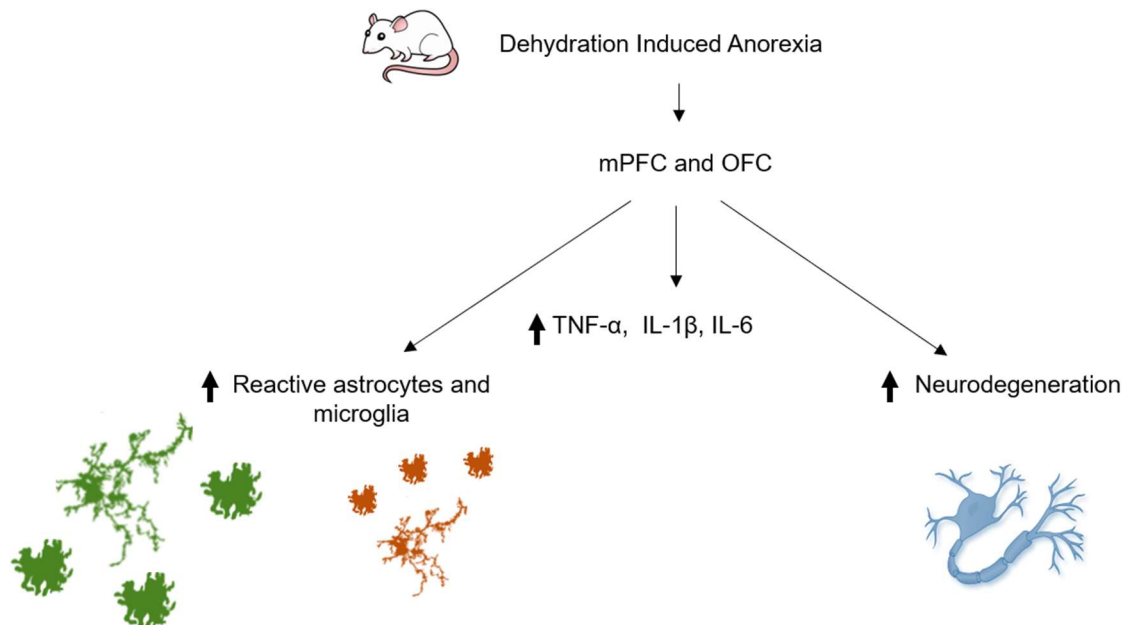
Palabras clave: anorexia, corteza prefrontal, microglía, astrocitos, citocinas proinflamatorias



ABSTRACT

The term anorexia describes any loss of appetite and concomitant reduction in food intake. The prefrontal cortex (PFC) integrates sensory input and participates in associative learning to promote (hunger) or inhibit (satiety) food-seeking behavior. The aim of this work was to test if anorexia is associated with a proinflammatory environment and neurodegeneration in the medial prefrontal cortex (mPFC) and the orbitofrontal cortex (OFC), specific regions of the PFC involved in reward food intake. Our results showed that dehydration-induced anorexia (DIA) increased IBA-1 expression (+82%), vimentin (+88%) and nestin (+84%), however, they reduced GFAP expression (-48%). Likewise, DIA promoted the de-ramified morphology of microglia and astrocytes, thereby increasing the de-ramified/ramified microglia ratio (mPFC +2515% and OFC +2540%) and de-ramified/ramified astrocytes (mPFC +1003% and OFC +661%). Furthermore, an increase in the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α (+98%), IL-6 (+85%) and IL-1 β (+70%) was induced. Finally, double immunofluorescence studies (Fluorjade-NeuN) showed neurodegeneration in mPFC (+ 21%) and in OFC (+ 30%) in DIA and FRR. Conclusion: DIA promoted a neuroinflammatory environment and neurodegeneration in mPFC and OFC.

Key words: anorexia, prefrontal cortex, microglia, astrocytes, pro-inflammatory cytokines



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTO.....	1
1.2 CIRCUITO DE HAMBRE Y SACIEDAD.....	2
1.2.1 HAMBRE.....	2
1.2.2 SACIEDAD.....	3
1.2.3 RECOMPENSA A LOS ALIMENTOS.....	4
1.3 ANOREXIA.....	6
1.3.1 ANOREXIA NERVOSA.....	6
1.4 MODELOS DE ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDARTACIÓN.....	7
1.5 ALTERACIONES EN EL CIRCUITO HAMBRE-SACIEDAD EN LA ANOREXIA.....	8
1.6 ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA CORTEZA PREFRONTAL.....	9
1.7 CÉLULAS GLIALES.....	10
1.7.1 MICROGLÍA.....	10
1.7.2 ASTROCITOS.....	13
1.8 NEURODEGENERACIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 CORTEZA PREFRONTAL Y SU PAPEL EN LA INGESTA DE ALIMENTOS.....	16
2.2 CÉLULAS GLIALES EN EL CIRCUITO HAMBRE SACIEDAD.....	18
2.3 CORTEZA PREFRONTAL, NEUROINFLAMACIÓN Y ANOREXIA.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVO GENERAL.....	19
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1 MODELO DE ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN.....	20
6.2 INMUNOFLUORESCENCIA.....	21

6.3 DOBLE MARCAJE FLUOROJADE NEUN.....	22
6.4 CONTEOS CELULARES.....	22
6.5 COLOCALIZACIÓN.....	24
6.6 ANÁLISIS DE FORMA CELULAR.....	24
6.7 WESTERN BLOT.....	24
6.8 ESTADÍSTICA.....	25
7. RESULTADOS.....	25
7.1 INGESTA DE ALIMENTOS Y PESO CORPORAL.....	26
7.2 DIA Y FFR MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES GLIALES.....	27
7.3 DIA Y FFR INCREMENTAN LA DENSIDAD DE MICROGLÍA.....	28
7.4 DIA Y FFR INCREMENTAN LA DENSIDAD DE LA MICROGLÍA DE- RAMIFICADA.....	30
7.5 DIA Y FFR INCREMENTAN EL COCIENTE MICROGLÍA DE- RAMIFICADA/RAMIFICADA.....	33
7.6 DIA Y FFR DISMINUYEN LA DENSIDAD DE ASTROCITOS.....	36
7.7 DIA Y FFR MODIFICAN LA MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS.....	38
7.8 DIA Y FFR INCREMENTAN EL COCIENTE ASTROCITO DE- RAMIFICADO/RAMIFICADO.....	41
7.9 DIA Y FFR INCREMENTAN LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS PRO- INFLAMATORIAS TNF α , IL-6 e IL-1 β	44
7.10 DIA Y FFR PROMUEVEN NEURODEGENERACIÓN.....	46
8. DISCUSIÓN.....	48
9. CONCLUSIONES.....	52
10. REFERENCIAS.....	53
11. APÉNDICE.....	67
12. APÉNDICE 2. ARTÍCULO.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación del Hambre.....	2
Figura 2. Regulación de saciedad.....	4
Figura 3. Sistema de recompensa a los alimentos.....	5
Figura 4. Papel de mPFC y OFC en la ingesta de alimento.....	17
Figura 5. Modelo de anorexia inducida por deshidratación.....	21
Figura 6. Secciones de la Corteza prefrontal.....	23
Figura 7. Ingesta de alimento y peso corporal.....	27
Figura 8. DIA Y FFR incrementan la expresión de la proteína IBA-1, vimentina y nestina, pero reduce la de GFAP.....	28
Figura 9. DIA y FFR aumentan la densidad de microglía.....	29
Figura 10. DIA y FFR reducen el tamaño de las células microgliales, la complejidad y la longitud total de sus procesos/ramificaciones.....	32
Figura 11. DIA y FFR incrementan el cociente microglía de-ramificada/ramificada.....	34
Figura 12. DIA y FFR disminuyen la densidad de los astrocitos.....	37
Figura 13. DIA y FFR reducen el tamaño de los astrocitos, la complejidad y la longitud total de los procesos.....	40
Figura 14. DIA y FFR incrementan el cociente astrocito de-ramificado/ramificado.....	42
Figura 15. DIA y FFR incrementan la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β	45
Figura 16. DIA y FFR promueven neurodegeneración neuronal.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efecto de DIA sobre la microglía.....	35
Tabla 2 Efecto de DIA sobre los astrocitos.....	43
Tabla 3 Efecto de DIA sobre la neurodegeneración.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTO

La ingesta de alimentos se ha dividido en 4 fases: La primera es la iniciación: comienza con el hambre, que se define como un fuerte deseo o necesidad de alimento (Smith & Ferguson, 2008). La segunda fase de la ingesta de alimentos es la adquisición que implica la búsqueda de los alimentos, la ingesta de alimentos está influenciada por la recompensa o refuerzo positivo que causan los alimentos, por lo que son considerados reforzadores primarios capaces de dirigir comportamientos que conducen a su adquisición (Reichelt *et al.*, 2015). La tercera fase es la consumación, donde los alimentos son ingeridos y detectados a nivel cefálico y gastrointestinal y finalmente la terminación, en donde los mecanismos de saciedad entran en acción. La sensación de saciedad suprime potencialmente la ingesta de energía hasta que vuelva el hambre y esto conduce a la finalización de la ingesta de alimentos (Watts, 2000).

La ingesta de alimento es regulada por un sistema homeostático, en donde el hipotálamo recibe información del estado energético del organismo y en consecuencia envía señales a los órganos y sistemas periféricos para lograr un balance energético (Morton *et al.*, 2014). Con base en su acción, estas señales se clasifican en orexígenas (hambre) y anorexígenas (saciedad) (Morton *et al.*, 2014). Entre los principales neuropéptidos orexigénicos se encuentra el neuropéptido Y (NPY), la proteína Agouti (AGRP) y la ghrelina, mientras que entre los anorexígenos se encuentra la leptina, la insulina, el péptido PYY, la colecistocinina (CCK) y el péptido similar al glucagón 1 (GLP1) (Amin & Mercer, 2016; Tremblay & Bellisle, 2015).

1.2 CIRCUITO DE HAMBRE Y SACIEDAD

1.2.1. HAMBRE

El hambre está influenciada por una disminución de la insulina y la leptina; así como un incremento en los niveles de grelina y GLP1 (Amin & Mercer, 2016; Tremblay & Bellisle, 2015), cuyas señales son recibidas por el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo por medio de los receptores a grelina (GHS-R) (Perello *et al.*, 2018), a insulina (InsRs) (Cassaglia *et al.*, 2011) y a leptina (LepR) (Gamber *et al.*, 2012). Al disminuir la insulina y la leptina, e incrementar la grelina, las neuronas AgRP/NPY del ARC se activan y liberan a la proteína r-agouti (AgRP) y al NPY, lo que por un lado, inactiva a las neuronas de proopiomelanocortina (POMC) y las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) y por otro lado activa al núcleo lateral del hipotálamo (LH), aquí las neuronas producen la hormona concentradora de melanina (MCH) y la orexina, que son dos péptidos orexigénicos que estimulan la ingesta de alimentos (Lebrun *et al.*, 2006) (Figura 1), la activación de LH a su vez promueve la activación de los sistemas de recompensa y motivación por la búsqueda de alimentos, lo cual se detalla más adelante (Kenny, 2019).

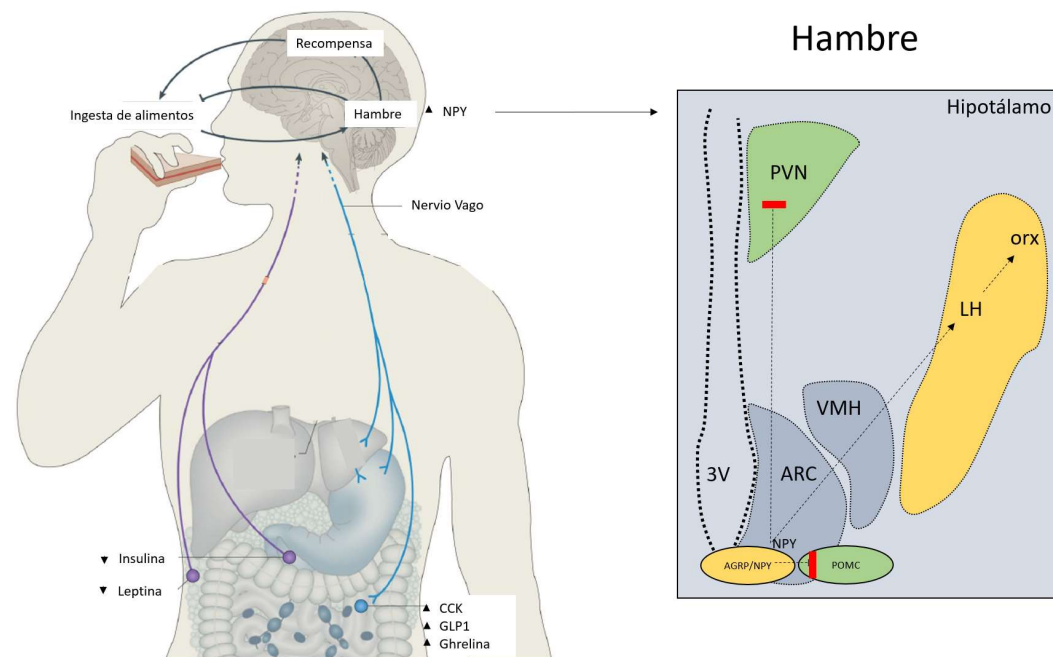


Figura 1. Regulación del Hambre. Una disminución de insulina y leptina, además de un incremento en los niveles de grelina, promueven el inicio de la ingesta de alimentos, lo cual es censado por ARC, esto promueve que las neuronas AgRP/NPY del ARC se activen y liberen AgRP y NPY, lo que, por un lado, inactiva a las

neuronas POMC y las neuronas del PVN y por otro lado activa a LH en donde las neuronas producen MCH un péptido orexigénico que promueve la ingesta de alimentos (modificado de Morton, Meek, y Schwartz 2014).

1.2.2 SACIEDAD

La saciedad está influenciada por una disminución de los niveles de grelina y GLP1, así como un incremento de los niveles de leptina e insulina, se perciben estos cambios por medio de receptores (Roh *et al.*, 2016) y se inactivan las neuronas AGRP/NPY (Roh *et al.*, 2016). A su vez, esto provoca que las neuronas POMC se activen y comiencen a secretar la hormona estimulante de melanocitos- α (α -MSH) (producida por el proceso post-transcripcional de POMC) (Roh *et al.*, 2016). Existen 5 tipos de receptores a melanocortinas (MC1R a MC5R). MC3R y MC4R se expresan en el SNC, principalmente en el hipotálamo. α -MSH es un agonista de los receptores MC3R y MC4R, mientras que AGRP es su antagonista. (Granell *et al.*, 2013) Una vez que las neuronas POMC liberan α -MSH esta se une y activa MC4R en el PVN promoviendo la disminución de la ingesta de alimentos (Adan *et al.*, 2006).

Las neuronas POMC proyectan al núcleo ventromedial (VMH) en donde también hay receptores a melanocortinas (Saito *et al.*, 2001) lo que promueve la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), estas neuronas proyectan al núcleo paraventricular, en donde hay receptores de tropomiosina cinasa B (TrkB) receptores de BDNF lo cual contribuye también a la supresión de la ingesta de alimentos (Saito *et al.*, 2001) . El α -MSH y el BDNF promueven la activación de las neuronas de oxitocina en el PVN. La oxitocina podría afectar el apetito indirectamente por la alteración de los niveles de otras hormonas reguladoras del apetito como por ejemplo CCK y GLP1 (Lawson, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Las neuronas del PVN proyectan al núcleo del tracto solitario (NTS) y en respuesta a la oxitocina liberada por este, se activa la producción de colecistoquinina (D'Agostino *et al.*, 2016). La colecistoquinina es un péptido secretado por las células endócrinas en el yeyuno en respuesta a los nutrientes lo que promueve la producción de los neuropéptidos anorexigénicos, desencadenando la inhibición de la ingesta de alimentos (Figura 2) (Aponte *et al.*, 2011; Atasoy *et al.*, 2012).

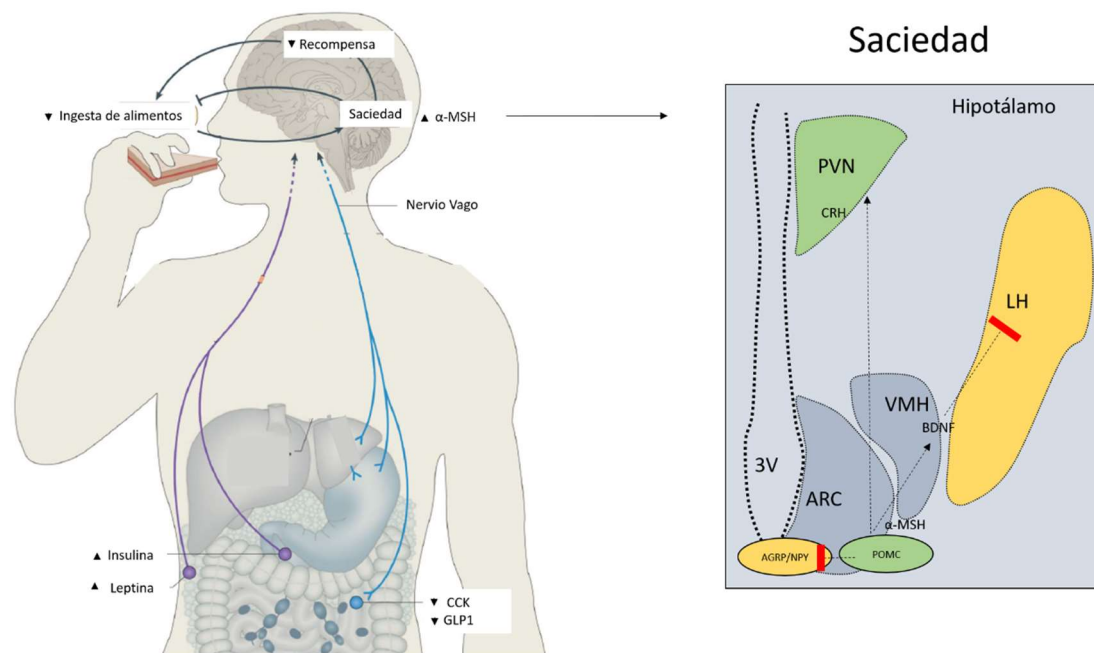


Figura 2. Regulación de saciedad. Cuando los niveles de grelina se reducen y los de leptina e insulina incrementan, las neuronas AGRP/NPY se inactivan, mientras que las neuronas POMC se activan y secretan α -MSH. α -MSH inhibe la ingesta de alimentos a través su unión a los receptores a melanocortinas del PVN. Las neuronas POMC proyectan al VMH, lo que promueve la producción de BDNF, que contribuye también a la supresión de la alimentación. En el PVN α -MSH y BDNF promueven la activación de las neuronas de oxitocina. La oxitocina a su vez podría afectar el apetito indirectamente por la alteración de los niveles de otras hormonas reguladoras del apetito como por ejemplo CCK y GLP1 (modificado de Morton, Meek, y Schwartz 2014).

1.2.3. RECOMPENSA A LOS ALIMENTOS

Los alimentos, son considerados reforzadores primarios capaces de dirigir comportamientos que conducen a su adquisición. Estos reforzadores ejercen muchos de sus efectos sobre el comportamiento a través de la activación del circuito mesocorticolímbico que implica proyecciones desde el LH, el área ventral tegmental (VTA), el núcleo accumbens (Nac), el hipocampo, la amígdala y la PFC (Reichelt *et al.*, 2015).

El hambre se asocia con el incremento de los sistemas de recompensa (Kenny, 2019). Como se mencionó anteriormente, el incremento de grelina y GLP1 promueve la activación del LH a través de NPY, esto conduce a la activación de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del LH que se proyectan al VTA (Coccorello & Maccarrone, 2018). Las neuronas GABAérgicas del LH inhiben a las neuronas GABAérgicas del VTA que normalmente se encuentran suprimiendo a las

neuronas dopaminérgicas de esta región, mientras que las glutamatérgicas estimulan la producción de dopamina en el VTA, la dopamina es enviada a la amígdala (AMY) al núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (PFC), lo que conduce al incremento de la búsqueda y motivación por el consumo de alimentos con la finalidad de promover la ingesta y recibir una recompensa calórica (Anderberg *et al.*, 2014; Coccorello, 2019; Land *et al.*, 2014; Ns *et al.*, 2009). En conjunto con esto, en el LH también hay neuronas que liberan orexina (Barson *et al.*, 2013), las cuales promueven la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Figura 3) (Coccorello, 2019; Saito *et al.*, 2001).

Posterior a la ingesta de alimento, la acción anorexigénica de la leptina y la insulina también tiene una acción supresora sobre el sistema de recompensa a los alimentos al inhibir al LH (Cassidy & Tong, 2017; Coccorello & Maccarrone, 2018).

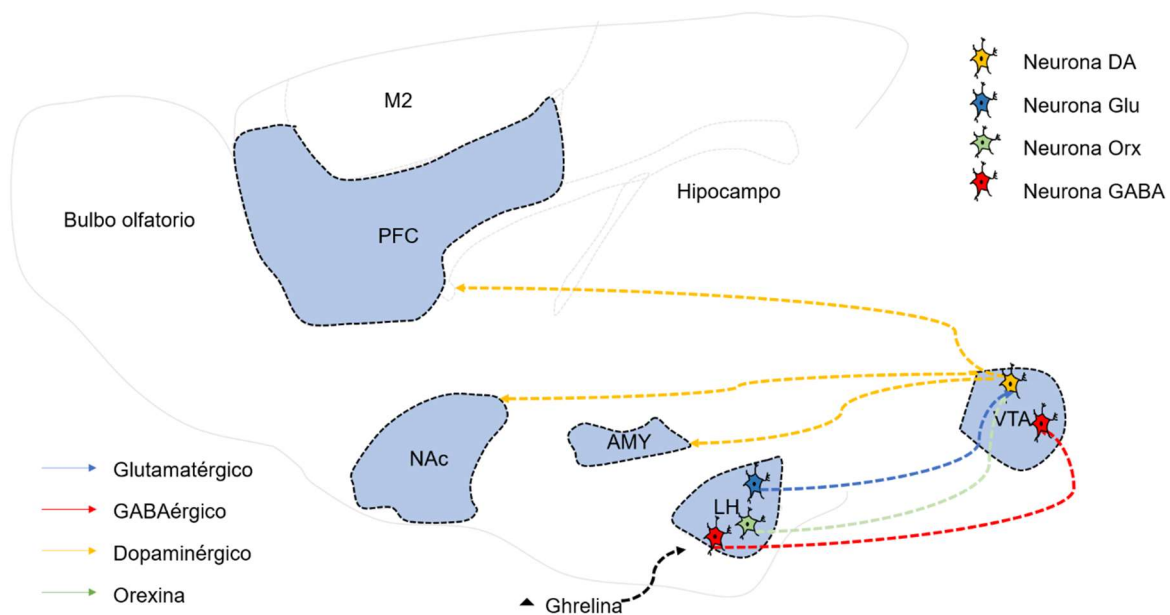


Figura 3. Sistema de recompensa a los alimentos. El hambre induce la producción de péptidos orexigénicos que promueven a su vez la activación de las neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y orexinérgicas del LH. Las neuronas GABAérgicas inhiben a las neuronas GABAérgicas del VTA que normalmente se encuentran suprimiendo a las neuronas dopaminérgicas de esta región. Mientras que las glutamatérgicas y oxitocinérgicas estimulan la producción de dopamina en el VTA, lo que conduce a la ingesta y la recompensa a los alimentos (Modificado de Coccorello 2019).

Cuando hay alteraciones fisiológicas en los mecanismos que regulan la ingesta de alimentos y se pierde el equilibrio de este sistema, pueden generarse problemas como la anorexia (Cano & Marín, 2015; Klastrup *et al.*, 2019).

1.3 ANOREXIA

El término anorexia describe cualquier pérdida de apetito y reducción concomitante en la ingesta de alimentos. Se ha dividido en dos categorías dependiendo si se trata de una respuesta adaptativa o patológica (Watts & Boyle, 2010).

La anorexia adaptativa es resultado de algún desafío biológico, por ejemplo, la respuesta que se da ante un proceso de deshidratación, 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 (Watts & Boyle, 2010).

La anorexia patológica es aquella que acompaña a varios estados de enfermedad y puede subdividirse en dos grupos: 1) Donde la anorexia está asociada con estados de enfermedad como lo es la caquexia y 2) Donde la anorexia es una indicación primaria, como es el caso de la anorexia nervosa (Watts & Boyle, 2010).

1.3.1 ANOREXIA NERVOSA

El Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 5ª edición (DSMV) describe que la anorexia nervosa se caracteriza por una restricción de la ingesta de alimento que conduce a un peso corporal significativamente bajo ($IMC < 17.5 \text{ Kg/m}^2$), miedo intenso a aumentar de peso o engordar y distorsión de la imagen corporal (Manual de diagnóstico y estadística, 2014). El inicio de esta enfermedad ocurre principalmente durante la pubertad y la adolescencia. El 90% de los casos son corresponde a mujeres y el 10% a hombres (Galmiche *et al.*, 2019; Yager *et al.*, 2002). Existen distintos modelos experimentales para estudiar la anorexia, los cuales replican algunos rasgos característicos de la enfermedad psiquiátrica

humana (S. F. Kim, 2012). Uno de ellos es el modelo de anorexia adaptativa denominado modelo de anorexia inducida por deshidratación (DIA) (Alan G Watts, 1998), el cual fue utilizado para desarrollar este proyecto

1.4 MODELO DE ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN

Existen distintos modelos experimentales para estudiar la anorexia, los cuales replican algunos rasgos característicos de la enfermedad psiquiátrica humana (Kim, 2012). Uno de ellos es el modelo de anorexia adaptativa denominado modelo de anorexia inducida por deshidratación (DIA) (Watts, 1998), el cual fue utilizado para desarrollar este proyecto.

El modelo DIA fue desarrollado por Watts y colaboradores (Watts, 1998), el cual consiste en sustituir el agua por una solución salina (2.5%) que las ratas ingieren, lo que reduce significativamente el consumo de alimentos, de manera voluntaria, y su peso corporal (Méquinion *et al.*, 2015). La anorexia que acompaña al consumo de solución salina es un mecanismo conductual adaptativo crítico que ayuda a proteger la integridad de los compartimientos de líquidos durante períodos prolongados de deshidratación celular (Watts & Boyle, 2010). Esta anorexia se revierte rápidamente una vez que los animales recuperan el acceso al agua potable (Watts, 1998). Su relativa simplicidad y reproducibilidad hace que este modelo sea útil para investigar sobre la neurobiología de la anorexia (Watts & Boyle, 2010).

El modelo de DIA incluye un grupo de restricción alimentaria forzada (FFR), el cual ayuda a distinguir los efectos de la deshidratación. El grupo FFR solamente recibe la cantidad de alimento que el grupo DIA consume, de modo que se induce un equilibrio negativo de energía en ambos, difiriendo básicamente en la motivación para ingerir alimento. Es decir, los animales deshidratados disminuyen su ingesta de alimentos mientras que FFR comería cantidades semejantes al grupo control si se les ofreciera el alimento (Gortari, 2009).

Se han estudiado algunas vías neuronales hipotalámicas en este modelo. Observando que tanto el grupo de DIA como el de FFR presentan las mismas

características endócrinas y neuropeptidérgicas que normalmente se observan en la restricción calórica: como el aumento de la concentración sérica de corticosterona, la disminución en la concentración de leptina e insulina, en ARC hay un aumento en la expresión de NPY y una disminución en la expresión de POMC y neurotensina (Watts *et al.*, 1999). A pesar de estos cambios neuroendócrinos, la motivación por la ingesta de alimento está inhibida aún en condiciones de equilibrio negativo de energía en DIA, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos neuronales que se activan durante la anorexia para inhibir el consumo de alimento (Gortari, 2009). Hasta ahora, se han encontrado algunas diferencias entre DIA y FFR que podrían ayudar a explicar la inhibición de la ingesta de alimento en DIA: 1) Incremento en la expresión de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el LH en DIA que además correlaciona positivamente con el grado de anorexia que presentan los animales (Watts *et al.*, 1999). 2) DIA muestra incremento de la hormona liberadora de tirotrópina TRH en PVN, mientras que en FFR esta se encuentra disminuida (Gortari *et al.*, 2009).

1.5 ALTERACIONES EN EL CIRCUITO HAMBRE-SACIEDAD EN LA ANOREXIA

Estudios previos mostraron que los circuitos de recompensa están alterados en pacientes con anorexia nervosa (Klastrup *et al.*, 2019; Wierenga *et al.*, 2015). Estudios de resonancia magnética reportaron que la activación de las regiones del cerebro relacionadas con la recompensa asociada a la ingesta de alimento están hipoactivadas en los pacientes con anorexia nervosa cuando tienen hambre, es decir, la actividad de estos es similar cuando tienen hambre a cuando están saciados (Wierenga *et al.*, 2015). Además hay estudios que sugieren alteraciones en los sistemas de dopamina, acetilcolina y opioides en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa a alimentos en pacientes con anorexia (Avena & Bocarsly, 2012). Una de las regiones implicadas con la recompensa a los alimentos que se encuentra alterada en pacientes con anorexia nervosa es la PFC, ya que se han observado por medio de estudios con resonancia magnética funcional alteraciones estructurales: como la reducción del volumen de mPFC (Brooks *et al.*, 2011; Mühlau *et al.*, 2007; Uher *et al.*, 2004) y OFC (Lavagnino *et al.*, 2018) y

funcionales como: la hipoactividad de la corteza prefrontal en respuesta a la recompensa a los alimentos el incremento en la actividad de la mPFC y la OFC en estos pacientes (Wierenga *et al.*, 2015)

Por lo anterior se ha propuesto que las alteraciones en la PFC podrían estar involucradas y promover aún más el comportamiento de anorexia dificultando su recuperación y contribuyendo a la recaída de esta enfermedad (Frank, 2013). Por lo que fue de interés en este proyecto, estudiar la mPFC y la OFC utilizando el modelo de anorexia DIA.

1.6 ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA CORTEZA PREFRONTAL

La corteza prefrontal forma parte de los lóbulos frontales del cerebro. Está implicada en gran cantidad de procesos cognitivos como la memoria operativa o de trabajo, funciones ejecutivas, toma de decisiones, planificación de comportamiento y el procesamiento de señales emocionales (Nestler, 2004).

La corteza prefrontal se divide en tres regiones: lateral (LPFC), medial (mPFC) y orbital (OFC). La LPFC incluye el área insular agranular dorsal y el área insular ventral (Dalley *et al.*, 2004), desempeña papeles importantes en el control cognitivo de orden superior, como la planificación, la inhibición del comportamiento y la toma de decisiones (Watanabe, 2009). La mPFC se subdivide en cingulada (CG), prelímbica (PRL) e infralímbica (IL) (Dalley *et al.*, 2004) y está implicada en la toma de decisiones, detección de errores, control ejecutivo, aprendizaje guiado por recompensas (Euston *et al.*, 2012) y memoria de trabajo (Smith *et al.*, 2018). Finalmente, OFC se divide en orbital lateral (LO), orbital ventral (VO), orbital medial (MO), orbital ventrolateral (VLO), orbital dorsolateral (DLO) y agranular insular (AI) (Dalley *et al.*, 2004) y se relaciona con comportamientos emocionales y sociales, aprendizaje y toma de decisiones (Izquierdo, 2017).

La corteza prefrontal de los roedores está formada por cinco capas: la capa I está conformada principalmente de dendritas apicales de neuronas piramidales, de

axones, y de algunos somas de interneuronas (Leiser *et al.*, 2015). Las capas II y III contienen los somas de pequeñas neuronas piramidales (van Aerde & Feldmeyer, 2015) y varios tipos de interneuronas: parvalbúmina+ (morfología tipo Basket (canasta) y Chandelier (candelabro), somatostatina+ (morfología Martinotti y non-martinotti) y receptor de serotonina ionotrópico+ (5HT3aR+) (morfología bipolar y multipolar) (Tremblay *et al.*, 2016). La capa IV no está definida en la corteza prefrontal de la rata (Leiser *et al.*, 2015). Las capas V y VI contienen los somas de neuronas piramidales grandes (que poseen dendritas apicales que se extienden hasta la capa I) y varios subtipos interneuronales: parvalbúmina+ (morfología tipo Basket y Chandelier), y somatostatina+ (morfología Martinotti y non-martinotti) (Tremblay *et al.*, 2016).

Además de las neuronas, la corteza prefrontal está conformada por células gliales, las cuales se encuentran distribuidas desde la capa I hasta la VI, en donde se encuentran astrocitos protoplasmáticos (Oberheim *et al.*, 2009), microglía (Kongsui *et al.*, 2014), y oligodendrocitos (Uranova *et al.*, 2004) y glía NG2 (Birey *et al.*, 2015).

1.7 CÉLULAS GLIALES

Las células gliales constituyen una gran fracción del cerebro de mamíferos, dependiendo la especie, las células gliales constituyen entre el 33 y el 66% de la masa cerebral total. La población de células gliales se puede subdividir en cuatro grupos principales: 1) glía NG2, 2) oligodendrocitos, 3) astrocitos y 4) microglía (Jäkel & Dimou, 2017). En este trabajo, fue de particular interés el estudio de los astrocitos y la microglía, debido a su importante papel como mediadores de la respuesta inmunológica en el SNC (Aschner, 1998) como se detallará más adelante.

1.7.1 MICROGLÍA

Las células de la microglía pertenecen al sistema inmune innato y son los macrófagos tisulares residentes del sistema nervioso central (SNC), incluidos el cerebro, la médula espinal, la retina y el bulbo olfatorio (Ginhoux *et al.*, 2010).

Comprenden el 10% de la población del SNC. Las células microgliales se desarrollan temprano durante la embriogénesis a partir de células precursoras mieloides en el saco vitelino embrionario y migran al área del SNC alrededor del día embrionario 8.5 (Ginhoux *et al.*, 2010). La microglía tiene una multitud de funciones, incluido el apoyo al desarrollo del SNC y la sinaptogénesis, el mantenimiento de la homeostasis, la neurogénesis, así como la contribución a una respuesta inmunológica contra agentes infecciosos, enfermedades degenerativas, derrames cerebrales y traumatismos (Lannes *et al.*, 2017). Son fagocitos importantes y esenciales para el desarrollo del SNC, ya que eliminan las neuronas apoptóticas, producen factores de crecimiento y contribuyen a la función y la organización estructural del tejido nervioso. La microglia juega un papel importante en la neurogénesis adulta y en la remodelación del SNC, especialmente al contribuir a la estructura y función de la sinapsis (Lannes *et al.*, 2017).

La microglia adopta una morfología ramificada caracterizada por un cuerpo celular pequeño y múltiples procesos ramificados largos y delgados que pueden extenderse hasta 50 μm desde el soma, estas microglías se definieron clásicamente como células en reposo (Smolders, 2019). Sin embargo, diversas señales pueden activar a la microglía, incluidos los factores intrínsecos derivados del daño celular y tisular, por ejemplo: un accidente cerebrovascular, una lesión traumática, así como factores inflamatorios extrínsecos como las citocinas o los productos microbianos. Por lo anterior, la microglía juega un papel importante en la respuesta inmunológica contra agentes infecciosos que invaden el SNC incluidos virus, bacterias y parásitos (Anttila *et al.*, 2017). A través de los receptores tipo Toll (TLR) y receptores de reconocimiento de patrones transmembrana que inician señales en respuesta a diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) la microglía responde contra agentes infecciosos que invaden el SNC (Okun *et al.*, 2011). Por otro lado, en respuesta al daño tisular la microglía cuenta con los ligandos de TLR endógenos denominados patrones moleculares asociados al daño (DAMP) (Okun *et al.*, 2011). Así mismo, para detectar factores inflamatorios extrínsecos la microglía expresa receptores a citocinas (Subramaniam & Federoff, 2017). La microglía, muestra cambios funcionales y morfológicos al activarse.

Liberación de citocinas proinflamatorias. La activación de los TLR activan vías de señalización dependientes del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y el adaptador inductor de interferón- β que contiene el dominio TIR (TRIF), lo que activa el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B) promoviendo la transcripción de citocinas proinflamatorias (Okun *et al.*, 2011) como TNF- α , IL-1 β e IL-6, además de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Timmerman *et al.*, 2018).

Fagocitosis. A través de las cascadas de señalización ITAM (región o secuencia de activación de inmunorreceptor basados en tirosina) la microglía activada adquiere actividad fagocítica para facilitar la eliminación de patógenos, desechos celulares y material apoptótico (Linnartz-Gerlach *et al.*, 2014)

Proliferación. Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto, se sabe que el incremento de citocinas proinflamatorias también aumenta la producción de peróxido de hidrógeno derivado de la NADPH oxidasa, lo cual parece estimular la proliferación de microglía, ya que ésta se atenúa con inhibidores de la NADPH oxidasa (Jekabsone *et al.*, 2006).

Migración. La microglia activada tiene la capacidad de migrar, aunque aún no queda completamente claro el mecanismo, la microglía exhibe una migración direccional hacia el sitio de la lesión utilizando un gradiente quimioatrayente (Fan *et al.*, 2017). El ATP liberado de las neuronas y terminales nerviosas lesionadas induce quimiotaxis de la microglía (Davalos *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2001). El receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2 (TREM2) parece jugar un papel importante en este proceso, ya que la carencia de este receptor reduce considerablemente la migración de la microglía (Mazaheri *et al.*, 2017).

Morfología. La microglía reactiva modifica su morfología, presenta hipertrofia del soma y retracción de los procesos, la proteína de unión a calcio ionizada 1 (IBA-1) parece jugar un papel importante en el cambio de esta morfología. IBA-1 es una proteína de unión a calcio que se expresa específicamente en la microglía y coopera con L-fimbrina en la reorganización de actina para facilitar el cambio en su morfología, la migración y la fagocitosis de la microglía cuando se encuentra en estado reactivo (Ohsawa *et al.*, 2004).

Los fenotipos de la microglía incluyen M1 y M2. La microglía M1 predomina al inicio del daño en SNC, cuando se amortigua el proceso de inmunoresolución y reparación predomina la microglía M2 (Tang & Le, 2016). La microglía M1 entonces suele ser la respuesta inicial al insulto, es la encargada de liberar citocinas proinflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, estas acciones permiten que M1 elimine agentes infecciosos y fagocite los desechos además de comenzar la respuesta inmune. Cuando la respuesta inflamatoria disminuye comienza a darse una respuesta antiinflamatoria, en la cual la microglía se polariza al fenotipo M2, las cuales promueven una respuesta anti-inflamatoria y la reparación de tejidos dañados (Tang & Le, 2016) liberando citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-4, IL-10 y TGF- β (Wang *et al.*, 2015), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y arginasa 1 (Arg1) (Parisi *et al.*, 2016).

1.7.2 ASTROCITOS

Los astrocitos son el tipo de célula glial más abundante del sistema nervioso central (SNC) y son esenciales para la homeostasis cerebral, ya que proporcionan metabolitos y factores de crecimiento a las neuronas, apoyan la formación de sinapsis y la plasticidad, y regulan el equilibrio extracelular de iones, fluidos y neurotransmisores (Sofroniew, 2009). Gracias a su ubicación estratégica en estrecho contacto con las células residentes en el SNC (neuronas, microglía, oligodendrocitos y otros astrocitos) y vasos sanguíneos, los astrocitos participan en el mantenimiento y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB). Los astrocitos también son células inmunocompetentes capaces de detectar señales de peligro, detectan cambios moleculares en su entorno extracelular (Farina *et al.*, 2007) y responden liberando moléculas extracelulares como factores neurotróficos (como BDNF, VEGF y bFGF) y factores inflamatorios (como IL-1 β , TNF- α y NO) (Li *et al.*, 2019). Cuando ocurre algún daño del sistema nervioso central (SNC), los astrocitos alteran sus características morfológicas y funcionales adoptando un fenotipo reactivo (Cekanaviciute & Buckwalter, 2016), dentro de estos cambios destacan:

Morfología. Los astrocitos presentan cambios en su morfología cuando presentan un fenotipo reactivo, su soma se hipertrofia y disminuye el número de procesos (Sun & Jakobs, 2012). Las neuronas disfuncionales y la microglía reactiva liberan una amplia gama de moléculas, que se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de los astrocitos. Estas señales activan vías intracelulares como la vía JAK / STAT3 que es activada por interleucinas como IL-6. Tras la unión de las citocinas al receptor gp-130, la cinasa JAK se activa y recluta a STAT3 en el receptor gp-130. JAK fosforila STAT3, que se dimeriza y se transporta al núcleo, donde se une a secuencias consenso (elemento sensible a STAT, ser) en la región promotora de sus genes diana. En los astrocitos, la vía JAK / STAT3 regula la transcripción de GFAP, nestina y vimentina, filamentos intermedios que conforman a los astrocitos y se encuentran sobre expresados cuando los astrocitos son reactivos (Ben Haim *et al.*, 2015). Estos cambios se asocian a cambios en la morfología de los astrocitos reactivos que se caracterizan por hipertrofia del soma y procesos (Kang & Hébert, 2011; Li *et al.*, 2019).

Migración. Los astrocitos reactivos tienen la capacidad de migrar, las acuaporinas (canales de agua), parecen jugar un papel importante en la migración de los astrocitos reactivos, en específico la acuaporina 4 (AQP4), ya que los astrocitos de ratones que carecen de AQP4 no tienen la capacidad de migrar (Kang & Hébert, 2011).

Fagocitosis. Los astrocitos reactivos funcionan como fagocitos cuando hay algún daño en el cerebro. Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto, pero se sabe que la proteína transportadora de casete unida a ATP A1 (ABCA1) incrementa cuando los astrocitos se vuelven reactivos y que esto es suficiente para promover la fagocitosis (Morizawa *et al.*, 2017).

Al igual que la microglía, existen dos tipos de astrocitos reactivos, denominados A1 y A2. Los astrocitos A1 regulan a la alza genes del sistema de complemento (grupo de proteínas plasmáticas y de membrana celular claves en el proceso de la defensa inmunológica) (Liddelow *et al.*, 2017), además de secretar neurotoxinas como lipocalina 2 (Lcn2) (Bi *et al.*, 2013). En contraste, los astrocitos

A2 regulan a la alza factores neurotróficos que pueden promover la supervivencia neuronal o la reparación sináptica (Li *et al.*, 2019).

La activación crónica de los astrocitos y la microglía pueden promover neurodegeneración (Li *et al.*, 2019; Lull & Block, 2010).

1.8 NEURODEGENERACIÓN

La neurodegeneración se define como la pérdida de estructura y función de las células del cerebro (Crews, 2008). La microglía, al igual que los astrocitos están directamente implicados en enfermedades neurodegenerativas (Lull & Block, 2010; Maragakis & Rothstein, 2006). La microglía activada de manera crónica libera múltiples factores neurotóxicos, incluido TNF- α , óxido nítrico, IL-1 β y especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daños neuronales progresivos (Lull & Block, 2010). De manera similar, los astrocitos reactivos en condiciones patológicas, pueden ser neurotóxicos cuando producen citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Li *et al.*, 2019).

Se han propuesto distintos mecanismos sobre cómo la microglía y los astrocitos reactivos promueven neurodegeneración: 1) Activación aguda de la NADPH oxidasa (PHOX) que se encuentra en la microglía y la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa (iNOS). La activación de PHOX promueve la proliferación microglial y activación inflamatoria. La activación de PHOX por sí sola no causa daño neuronal, pero cuando se combina iNOS resulta en una apoptosis aparente a través de la producción de peroxinitrito. El óxido nítrico (NO) originado por la actividad de la iNOS también induce muerte neuronal porque el NO inhibe a la enzima citocromo oxidasa en competencia con el oxígeno, lo que resulta en la liberación de glutamato y finalmente excitotoxicidad. 2) Fagocitosis microglial de las neuronas (Brown & Neher, 2010). 3) Producción de lipocalina 2 (Icn2), Icn2 es secretada por los astrocitos y es selectivamente tóxico para las neuronas (Bi *et al.*, 2013). 4) Excitotoxicidad por glutamato. Otro de los mecanismos propuestos es que el exceso de TNF- α estimula a su receptor TNFR1 en los astrocitos, lo que inhibe la captación de glutamato. El incremento de glutamato genera un incremento de la

liberación de calcio, se cree que esto genera apoptosis al activarse proteasas (enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas) dependientes de calcio conocidas como calpaínas. Una vez activadas, las calpaínas degradan los sustratos de membrana, citoplasmáticos y nucleares, lo que lleva a la descomposición de la arquitectura celular y finalmente a la apoptosis (Olmos & Lladó, 2014; Pinton *et al.*, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1 CORTEZA PREFRONTAL Y SU PAPEL EN LA INGESTA DE ALIMENTOS

La mPFC y la OFC participan en la ingesta de alimento, por una parte, la OFC recibe información sensorial de varias modalidades, incluyendo el olfato, el gusto, las aferencias viscerales, sensación somática y la visión (Öngür & Price, 2000), de igual forma juega participa en el proceso de valoración y recompensa a los alimentos (Zald, 2009). Por otra parte, la mPFC contribuye en la motivación por el consumo de alimentos (Petrovich *et al.*, 2007), así como la búsqueda de recompensa a los alimentos (Coccarello, 2019; Reppucci & Petrovich, 2016).

Adicionalmente, distintos estudios han mostrado que la activación de mPFC puede promover o inhibir la ingesta de alimento independientemente si los animales tiene hambre o ya han sido alimentados: la estimulación optogenética de las proyecciones glutamatérgicas que van de la mPFC al NAc inhiben transitoriamente la alimentación (Prado *et al.*, 2016). Por otra parte, la estimulación optogenética de las neuronas glutamatérgicas que expresan el receptor a dopamina D1 en la corteza prefrontal medial, incrementan la ingesta de alimento y la inhibición de las mismas decrece la ingesta (Land *et al.*, 2014) (Figura 4A). La OFC también está implicada en la búsqueda del alimento. Se demostró que en ratones, en donde se midió la actividad eléctrica simultánea de los conjuntos neuronales la OFC, la corteza insular (IC), AMY y el NAc, era necesaria la actividad sincrónica neuronal de estas regiones del cerebro para que el animal decidiera ir a consumir el alimento que más le agradaba (Gutierrez *et al.*, 2010) (Figura 4B).

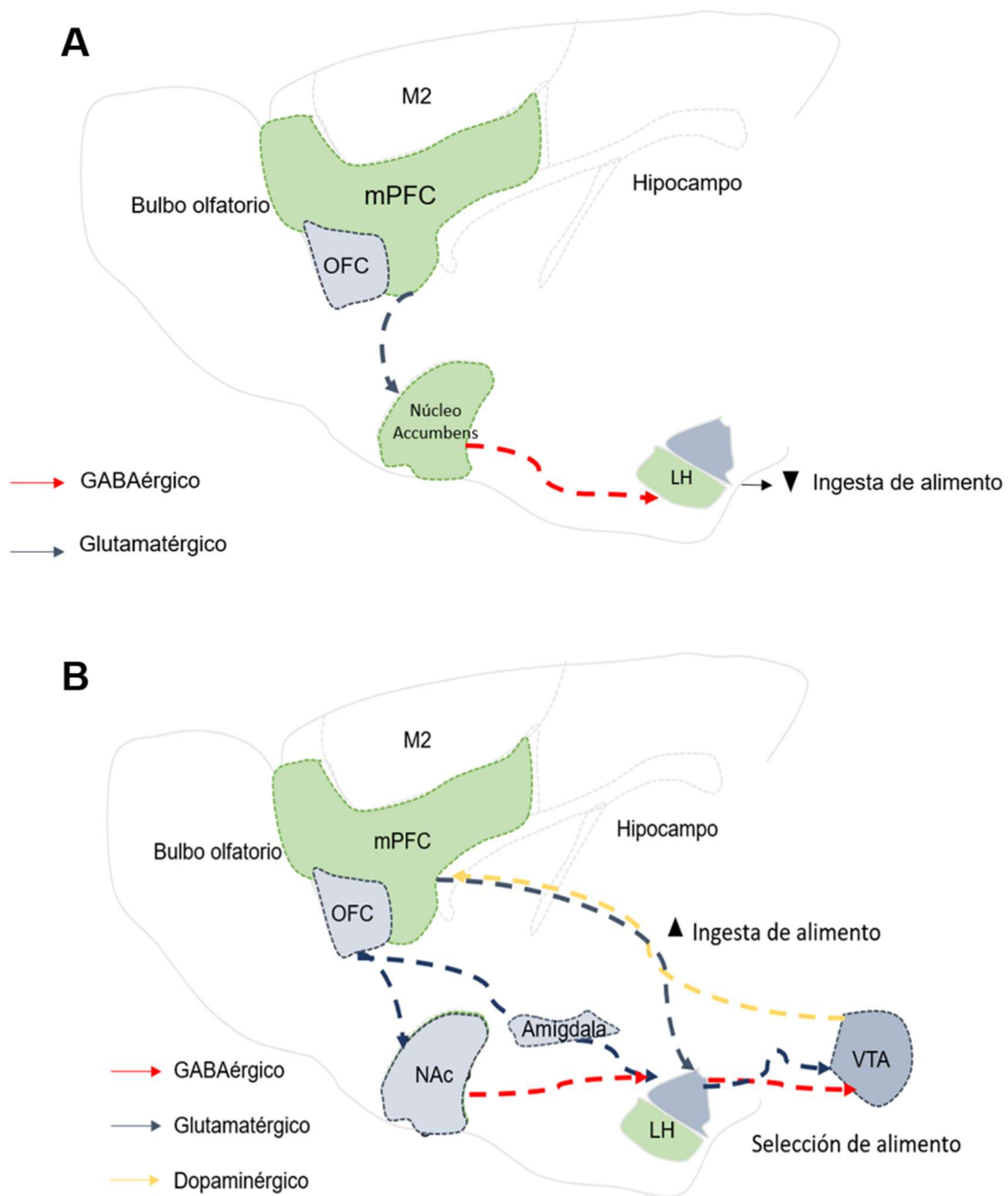


Figura 4. Papel de la mPFC y la OFC en la ingesta de alimento. A) Las proyecciones glutamatérgicas que van de la mPFC al NAc inhiben transitoriamente la alimentación ya que el NAc tiene proyecciones gabaérgicas hacia el LH y lo inhibe. Por otra parte, las neuronas glutamatérgicas que expresan el receptor a dopamina D1 en la mPFC incrementan la ingesta de alimentos, mientras que la inhibición de estas decrece la alimentación. B) La actividad sincrónica de los juntos neuronales de la OFC, la IC, AMY y el NAc, es necesaria para que los animales decidan ir a consumir un alimento (modificado de Yamamoto y Ueji 2011).

2.2 CÉLULAS GLIALES EN EL CIRCUITO HAMBRE SACIEDAD

Algunos estudios han mostrado la participación de células gliales en la regulación de la ingesta de alimentos: los astrocitos son capaces de censar los niveles de glucosa (Camandola, s. f.) y grelina (Frago & Chowen, 2017), además expresan receptores a varias hormonas como la leptina y la insulina (García-Cáceres *et al.*, 2016). Cuando los niveles de grelina disminuyen, aumentando por lo tanto los de glucosa, después de la ingesta del alimento, los astrocitos liberan adenosina, que inhibe a las neuronas AGRP/NPY, regulando de esta manera la saciedad (Yang *et al.*, 2015).

Por su parte, algunos estudios han vinculado a la microglía con el desarrollo de anorexia: la activación del receptor tipo toll 2 (TLR2) por la inyección intracerebroventricular del ligando sintético Pam3CSK4 desencadena inflamación a nivel hipotalámico y la activación de la microglia en ARC, lo cual resulta en una mayor actividad de las neuronas POMC, de manera que los animales desarrollan anorexia (Jin *et al.*, 2016).

2.3 CORTEZA PREFRONTAL, NEUROINFLAMACIÓN Y ANOREXIA

Dado que la PFC regula la ingesta de alimento, en este trabajo proponemos que alteraciones en esta región, como lo es un proceso inflamatorio, podría estar asociado con anorexia. Trabajos anteriores apoyan esta hipótesis, ya que han relacionado la anorexia nervosa con incrementos en la expresión de citocinas proinflamatorias (Gibson & Mehler, 2019; Grzelak *et al.*, 2017). Estudios realizados en personas diagnosticadas con anorexia nervosa reportaron niveles significativamente elevados de citocinas proinflamatorias en el suero, en particular TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Solmi *et al.*, 2015). Además, la inyección intracerebroventricular de estas citocinas, promueven la disminución de la ingesta de alimento (Plata-Salamán *et al.*, 1996). Adicional a esto, se ha demostrado que un proceso neuroinflamatorio generado con la inyección de lipopolisacáridos (endotoxina que compone la membrana externa de las bacterias gram negativas y se utiliza como un estímulo proinflamatorio para la microglía (Lively & Schlichter, 2018) en la PFC promueve la disminución de peso corporal en ratas (Pablos *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de anorexia nervosa aumentó alarmantemente en las últimas dos décadas, actualmente oscila entre 5 y 5.4 por cada 100,000 personas/año. En México, se atienden 20 mil casos de anorexia anualmente y se estima que más de un millón de jóvenes están afectados por esta enfermedad. Adicionalmente, la anorexia nervosa tiene una tasa de mortalidad del 6%, lo que la convierte en un problema de salud importante (*IMSS Trastornos Alimenticios*). No obstante, la neurobiología del trastorno se desconoce (Bulik *et al.*, 2007; Méquinion *et al.*, 2015). Estudios han reportado la reducción de volumen en mPFC y OFC de pacientes con anorexia nervosa (Brooks *et al.*, 2011; Lavagnino *et al.*, 2018; Mühlau *et al.*, 2007; Uher *et al.*, 2004), lo cual sugiere que estas regiones del cerebro están implicadas en la neurobiología de la anorexia (Öngür & Price, 2000; Petrovich *et al.*, 2007; Reppucci & Petrovich, 2016). Adicional a esto, se encontró un incremento de marcadores de genes relacionados con microglía reactiva (RAB20, RRAD, GLIPR1, PLAK) en la corteza cerebral del cerebro postmortem de estos pacientes (Howard *et al.*, 2020). Se sabe que la microglía y los astrocitos activados de manera crónica libran factores neurotóxicos que pueden provocar daños neuronales progresivos (Lull & Block, 2010; Li *et al.*, 2019). Lo que podría explicar al daño en la recompensa de alimentos que se observa a nivel corteza (hipoactivación de PFC en pacientes con anorexia vs control) (Wierenga *et al.*, 2015). Así como las altas tasa de recaída que se observan en estos pacientes donde solamente el 33% de los pacientes se recupera completamente (Herzog *et al.*, 1992).

4. HIPÓTESIS

La anorexia promueve un ambiente neuroinflamatorio y neurodegeneración en mPFC y la OFC.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si DIA se acompaña de un incremento de citocinas proinflamatorias, astrocitos y microglía reactivos, así como de muerte neuronal en mPFC y OFC

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el efecto de la DIA sobre la expresión de marcadores gliales.
- 2) Investigar el efecto de la DIA sobre la densidad de astrocitos y microglía reactiva en la mPFC y la OFC.
- 3) Investigar el efecto de DIA sobre la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) en la PFC.
- 4) Evaluar el efecto de la DIA en la neurodegeneración en la mPFC y la OFC.

6. METODOLOGÍA

6.1 MODELO DE ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN

Para este estudio, se implementó el modelo de anorexia inducida por deshidratación (DIA) (Watts, 1998) (Figura 5). Se utilizaron ratas hembra Wistar de 180 – 200 g (45-55 días de edad), éstas se colocaron en cajas individuales y se dividieron en tres grupos diferentes: el primer grupo (control) recibió agua y comida *ad libitum*, el segundo grupo (DIA), recibió una solución salina al 2.5% y comida *ad libitum*. Finalmente, el tercer grupo de restricción alimentaria forzada (FFR), recibió agua *ad libitum* y la cantidad diaria de alimento consumido por el grupo DIA, este grupo sirvió como un control positivo para distinguir los efectos de la disminución de ingesta de alimento en ausencia de deshidratación. Los protocolos se desarrollaron durante 5 días. Posteriormente las ratas fueron sometidas a eutanasia por medio de una sobredosis de pentobarbital y se les extrajeron los cerebros para realizar los análisis por inmunofluorescencia y Western blot.

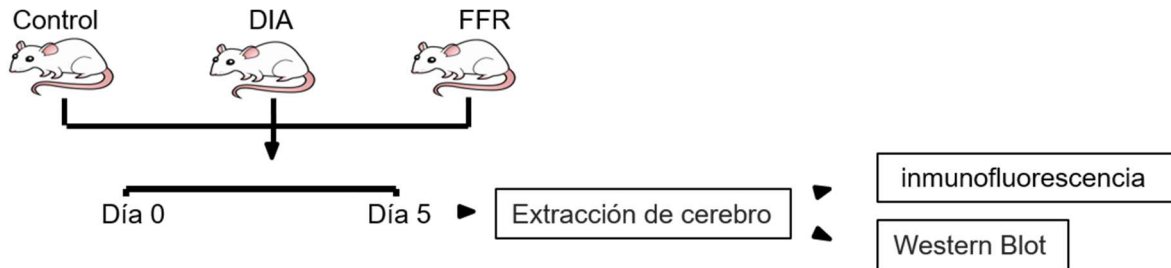


Figura 5. Modelo de anorexia inducida por deshidratación. Se trabajó con tres grupos: el grupo control que recibió agua y alimento *ad libitum*, el grupo DIA que recibió una solución salina al 2.5 % y comida *ad libitum* y el grupo de restricción alimentaria forzada (FFR) que recibió agua *ad libitum* y la cantidad diaria de alimento consumido por el grupo DIA. Después de 5 días, las ratas fueron sometidas a eutanasia y se extrajeron los cerebros para realizar inmunofluorescencia y Western blot. [Inmunofluorescencia en el recuadro con mayúscula la I, todas las palabras en tus recuadros empiezan con mayúscula]

6.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron para estimar la densidad de microglía, astrocitos y neuronas en la corteza prefrontal de la rata en los tres grupos experimentales: control, DIA y FFR. Las ratas se sometieron a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg) y se perfundieron con solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, pH 7.4), seguido de paraformaldehído (4%) en PBS, pH 7.4. Los cerebros se extrajeron y se fijaron durante 24 h en PFA (4%). Posteriormente, se colocaron en gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%) como método de crioprotección. Los cortes histológicos sagitales (30 μ m) se obtuvieron con el criostato y se almacenaron en una solución crioprotectora (15% de sacarosa, 30% de glicol de etileno, 20% de PBS) a -20 °C. Finalmente, se realizaron las inmunofluorescencias contra el marcador específico de astrocitos GFAP (Hol & Pekny, 2015), el marcador específico de microglía IBA-1 (Ohsawa et al., 2004) y un marcador específico de neuronas NeuN (proteína neuronal nuclear) (Kim *et al.*, 2009) con la técnica por flotación del tejido (Reyes-Haro *et al.*, 2015). Las secciones del tejido se enjuagaron tres veces con PBS durante 10 minutos. Luego se colocaron los tejidos en solución de bloqueo (albúmina de suero de burro al 5% y Tritón 1% en PBS) durante 1 h. Las secciones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo correspondiente: a) anticuerpo policlonal de conejo anti-IBA-1

(dilución 1: 1000, Wako, Life Sciences), b) anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP (dilución 1: 1000, DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA), c) anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (dilución 1:500, Millipore) a 4°C. Después de esto se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Finalmente, el anticuerpo primario se detectó con el anticuerpo secundario o el primario estaba marcado con Alexa 594 (1: 500, Invitrogen) o con Alexa 488 (1:500, Invitrogen). Las secciones se contra-tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se montaron con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.).

6.3 DOBLE MARCAJE FLUOROJADE NEUN

Se realizó un doble marcaje Fluorojade-NeuN como se reportó anteriormente con la finalidad de marcar neuronas en degeneración (Castro *et al.*, 2011). Primero, se realizó la inmunofluorescencia para NeuN, como se describió anteriormente. Posterior a la detección del anticuerpo primario con el anticuerpo secundario marcado con Alexa 594, se realizó la tinción con fluorojade, comenzando con un baño de agua destilada de 2 min, seguido de 5 min de permanganato de potasio (0,06%), bajo agitación. El exceso de permanganato se eliminó con 1 baño de agua destilada, seguido de incubación con FJC durante 10 min (dilución 0,0004%) y un baño adicional de 1 min de agua destilada. Las secciones histológicas recibieron un baño de xilol y se montaron con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.).

Las secciones de PFC se fotografiaron con una cámara digital (Photometrics Cool Snap FX, Tucson, AZ, EE. UU.) conectada a un microscopio Nikon (Nikon Eclipse E600, Tokio, Japón). Se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 780 Meta (Zeiss, Gottingen, Alemania) para imágenes confocales. Para distinguir Alexa 594 se utilizó longitud de onda de excitación / emisión 590/617 nm, para distinguir Alexa 488 se utilizó una longitud de onda de excitación/emisión 493/519 y DAPI (longitud de onda de excitación / emisión 350/460 nm).

6.4 CONTEOS CELULARES

La densidad de núcleos, astrocitos, microglía y neuronas se cuantificó en la mPFC (IL, PRL, CG1, CG2), en la OFC (MO y VO) y en la corteza motora secundaria

(M2) (Figura 6) utilizando el software CellProfiler (Lamprecht *et al.*, 2007). Las regiones IL, PRL, CG1 y CG2 están implicadas en la búsqueda de alimento (Broersen, 2000) y la motivación a comer (Petrovich *et al.*, 2007). Mientras que VO y MO reciben información sensorial relacionada con la alimentación como gusto, olfato, vista y aferencias viscerales (Öngür & Price, 2000).

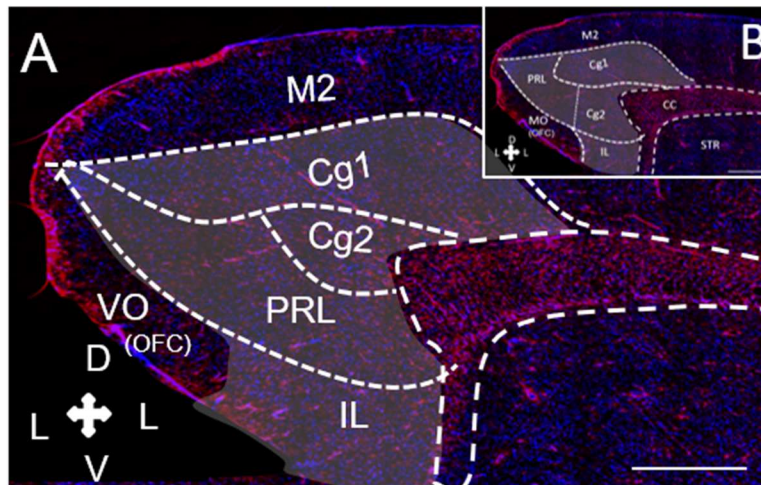


Figura 6. Secciones analizadas de la corteza prefrontal. Se muestra una imagen representativa de las regiones analizadas de la corteza prefrontal de una rata control (inmunofluorescencia contra IBA-1). A) Sección 0.90 mm lateral de la línea media (atlas Paxinos and Watson). B) Sección 0.40 mm lateral a la línea media (atlas Paxinos and Watson). Se analizó la corteza prefrontal medial (mPFC) en la cual se incluyó a la corteza prelímbica (PRL), infralímbica (IL), cingulada 1 y 2 (Cg1 y Cg2). Se analizó también la corteza prefrontal orbital (OFC) en la cual se incluyó la corteza ventral orbital (VO) y medial orbital (MO). Finalmente se analizó la corteza motora secundaria (M2).

La cuantificación de microglia se realizó en secciones sagitales de la PFC de las secciones 0,40 y 0,90 mm lateral a la línea media, según el atlas Paxinos y Watson (Büttner-enever, 1997). Las regiones PFC se identificaron con base en este atlas. Los conteos se realizaron utilizando el software CellProfiler (Lamprecht *et al.*, 2007): las células se identificaron como objetos primarios, considerando el tamaño, la forma de la célula, así como intensidad de la imagen.

Posteriormente se calculó el número de células para los grupos de control, DIA y FFR y se estimó la densidad (número de células por mm²). La relación microglia / núcleo y astrocito/núcleo se calculó dividiendo el número de células IBA-1+ y GFAP+ entre el número total de núcleos marcados con DAPI.

6.5 CO-LOCALIZACIÓN

Las células FJC / NeuN + se contaron con el plugin de EZcolocalization en ImageJ (Stauffer *et al.*, 2018). Este plugin identifica células individuales de las imágenes y posteriormente identifica las células que co-localizan en los dos canales. El coeficiente de correlación de Pearson (PCC) entre los dos canales se obtuvo con el plugin EZcolocalization. La co-localización completa se aceptó cuando $PCC = 1$, y la co-localización se representó como el número de células FJC-NeuN + / mm^2 para cada grupo experimental.

6.6 ANÁLISIS DE FORMA CELULAR

La microglía y los astrocitos modifican su morfología en respuesta a daños en el cerebro, estos cambios morfológicos incluyen área, perímetro, número de procesos, longitud total de procesos y complejidad de ramificación (endpoints) (Fernández-Arjona *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Estos parámetros se estimaron como se describió anteriormente (Morrison *et al.*, 2017). Todas las imágenes se convirtieron en imágenes binarias y posteriormente se realizó el esqueleto de la imagen utilizando el software ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda). El plugin análisis de skeleton de ImageJ se aplicó a las imágenes obteniendo los parámetros morfológicos mencionados anteriormente (área, perímetro, número de procesos, longitud total de procesos y endpoints). Con estos parámetros se realizó un análisis de clusters K-mean utilizando Matlab (MATLAB & Simulink). Se utilizó la prueba de silhouette para calcular el número ideal de cluster e identificar los diferentes fenotipos de microglía y astrocitos para finalmente calcular el cociente de microglía y astrocitos reactivos/ microglía y astrocito en reposo (Para más detalles ver apéndice1).

6.7 WESTERN BLOT

La corteza prefrontal se disectó como se describió anteriormente (Chiu *et al.*, 2007). La extracción de la proteína y el western blot se realizó como se reportó previamente (Reyes-Haro *et al.*, 2016). Brevemente, la PFC se obtuvo de tres ratas diferentes para cada grupo experimental (Control, DIA y FFR), se homogeneizaron

en solución de lisis (glicina 200 mM, NaCl 150 mM, EGTA 50 mM, EDTA 50 mM y sacarosa 300 mM) junto con un inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). El homogeneizado total se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C, finalmente los sobrenadantes se almacenaron a -80 ° C.

La concentración de proteína de cada muestra se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), y se utilizaron 30 µg de proteína total de cada muestra. La proteína se corrió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, se electrotransfirieron a la membrana de PVDF y se incubaron en solución de bloqueo (leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-T) durante 3 horas, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: (a) policlonal anti-IBA-1 (dilución 1: 5000, Wako); (b) monoclonal anti-TNF- α (dilución 1: 1000, Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.); (c) monoclonal anti-IL-6 (dilución 1: 1000, Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.); (d) policlonal anti-IL-1 β (dilución 1: 1000, Millipore); y (e) monoclonal anti-GAPDH (dilución 1: 1000, Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, y se colocaron los anticuerpos secundarios durante 4 horas a 4 °C: a) anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina de cabra anti-IgG de ratón (dilución 1: 2500; Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.), b) anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina de cabra anti-IgG de conejo (dilución 1: 2500; Santacruz, Dallas, TX, EE. UU.). La actividad de fosfatasa alcalina se detectó utilizando el kit de reacción de sustrato conjugado BCIP / NBT AP (Bio-Rad, EE. UU.). Las imágenes se adquirieron con un sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.). La intensidad de las bandas se cuantificó por medio de densitometría usando el software Image Lab 3.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.) (Image Lab Software).

6.8 ESTADÍSTICA

Se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Debido al comportamiento normal que presentaron los datos, se realizó la prueba ANOVAe una vía. En los casos en que se encontraron diferencias

significativas, se realizó una prueba post hoc de Tukey para conocer entre qué grupos se encontraban las diferencias; $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Estas pruebas se realizaron utilizando el software Origin 7.0 (Origin: Data Analysis and Graphing Software). Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar (S.E.M.).

7. RESULTADOS

7.1 INGESTA DE ALIMENTOS Y PESO CORPORAL

La ingesta de alimentos se redujo significativamente desde el primer día y para el quinto día del protocolo experimental, de manera voluntaria en el grupo DIA (80%) e impuesta en el grupo FFR (82%) comparado con el grupo control (CTL 20.2 ± 0.8 g, DIA 3.9 ± 0.4 g, FFR 3.4 ± 0.1 g; $p < 0.001$) (Figura 7A). La tasa de ingesta de alimentos del grupo control, presentó un comportamiento polinomial. Este grupo, consumió en promedio 20.2 ± 2.5 de alimento al día ($R^2 = 0.88$). Mientras la tasa de ingesta de alimento para los grupos DIA y FFR presentó un comportamiento lineal a la baja, con una disminución promedio de 2.82 ± 0.3 g de alimento al día ($R^2 = 0.91$) (Figura 7C).

El peso corporal también se redujo significativamente al quinto día del protocolo experimental, para el grupo DIA el peso corporal de las ratas se redujo 29% y para FFR 25% comparado con el grupo control (CTL 204 ± 3.9 , DIA 144 ± 2.9 , FFR 152 ± 1.9 ; $p < 0.0001$) (Figura 7B). El grupo control presentó una ganancia de peso corporal con un comportamiento lineal. La tasa de ganancia de peso promedio estimada fue de 4.6 ± 0.2 de peso por día (coeficiente $R^2 = 0.97$). Por el contrario, los grupos DIA y FFR disminuyeron su peso corporal linealmente. La tasa de pérdida de peso corporal estimada para el grupo DIA fue de 11.02 ± 1.3 por día (coeficiente $R^2 = 0.98$); mientras que para el grupo FFR fue de 8.82 ± 0.6 g por día (coeficiente $R^2 = 0.98$) (Figura 7D).

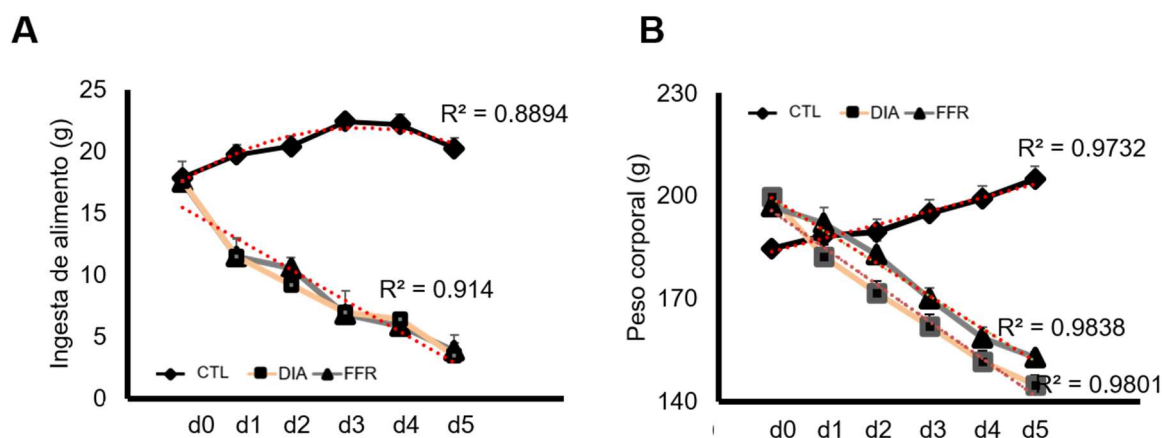


Figura 7. Ingesta de alimento y peso corporal. Se muestra la ingesta de alimento (A) y el peso corporal (B) durante los cinco días de los protocolos experimentales, para los tres grupos experimentales. En rojo, se muestra la línea de ajuste hecha a cada grupo para la ingesta de alimento y el peso corporal. Las barras muestran el error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control. $n = 7$.

7.2 DIA Y FFR MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES GLIALES

La expresión de las proteínas IBA-1, GFAP, vimentina y nestina se determinó con estudios de Western blot. IBA-1 incrementó en los grupos experimentales DIA (+82%) y FFR (+45%) en comparación con el grupo control ($F_{(2,6)} = 270.77001$, $p < 0.0001$) (Figura 8). Para los marcadores de astrocitos los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de GFAP para los grupos DIA (-48%) y FFR (-32%) ($F_{(2,6)} = 1368.6$, $p = 0.007$) (Figura 8). En contraste, la expresión de vimentina aumentó significativamente en los grupos DIA (+88%) y FFR (+62%) en comparación con el grupo control ($F_{(2,6)} = 83.26957$, $p = 0.005$) (Figura 8). Finalmente, la expresión de nestina también se incrementó en los grupos DIA (+84%) y FFR (+68%) respecto al control ($F_{(2,6)} = 129.28302$, $p = 0.002$) (Figura 8). El siguiente objetivo fue cuantificar la densidad y la morfología de la microglía y astrocitos.

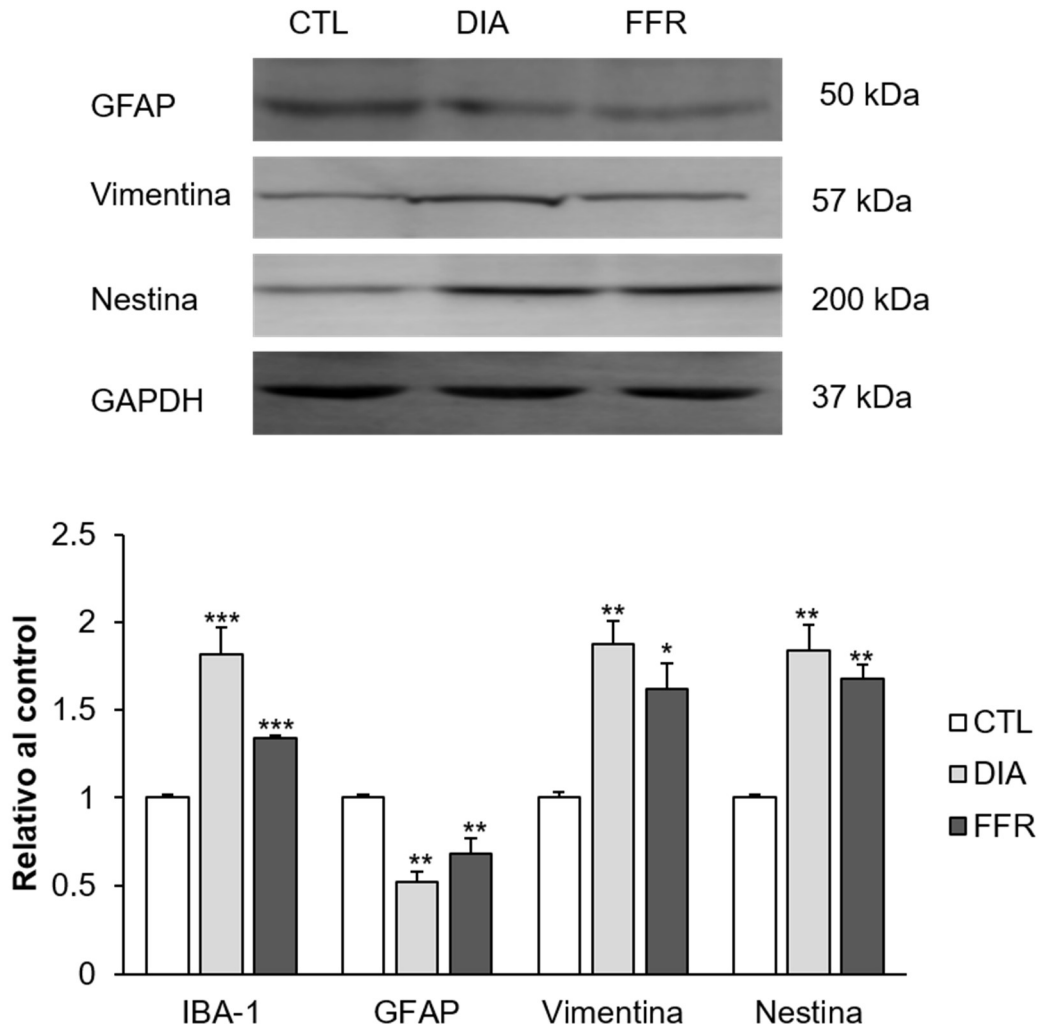


Figura 8. DIA y FFR incrementan la expresión de la proteína IBA-1, vimentina y nestina, pero reduce la de GFAP. A) Imagen representativa de Western blot de IBA-1, GFAP, vimentina y nestina. GAPDH se utilizó como control de carga. B) Densitometría de Western blot de IBA-1, GFAP, vimentina y nestina, la intensidad de las barras fue normalizada a su control (CTL) correspondiente. Las barras muestran el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control. $n = 3$.

7.3 DIA Y FFR INCREMENTAN LA DENSIDAD DE MICROGLÍA

La densidad de los núcleos y la microglía se cuantificó en la mPFC, la OFC y la M2 (ver tabla 1). El cociente microglía/núcleo se incrementó significativamente en la mPFC para el grupo DIA (+104%) y FFR (+124%) ($F_{(2,74)} = 8.93267$, $p < 0.0001$; $n = 7$) (Figura 9A). En la OFC se observó un incremento similar para DIA (+92%) y FFR (+101%) ($F_{(2,36)} = 19.84027$, $p < 0.0001$; $n=6$) (Figura 9B). No obstante, no se

observaron diferencias significativas entre los grupos en la M2 ($F_{(2,15)} = 0.03376$, $p = 0.96687$; $n=7$) (Figura 9C).

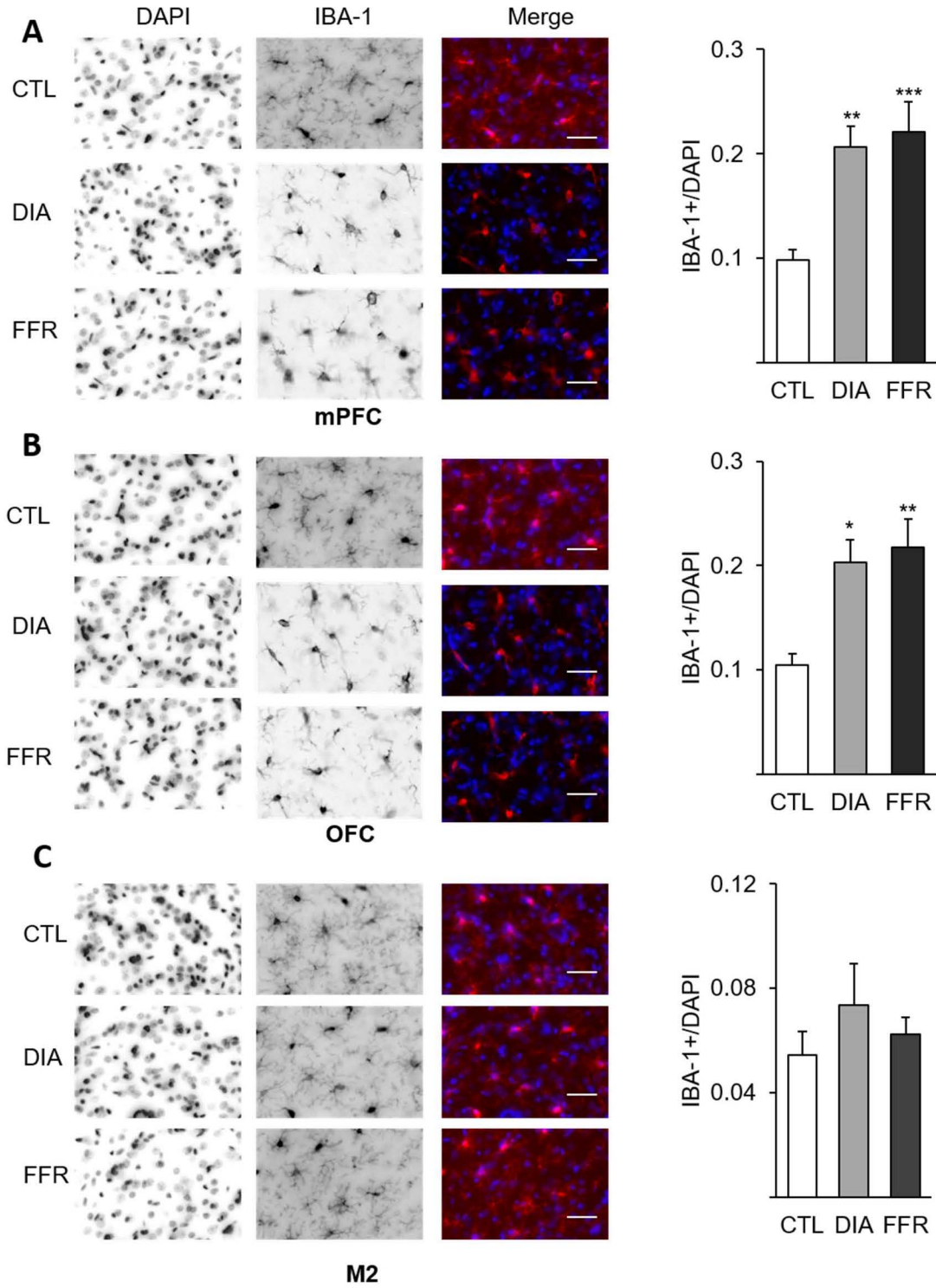


Figura 9. DIA y FFR aumentan la densidad de microglía. Imágenes representativas de secciones sagitales de mPFC, OFC y M2. Se muestran los núcleos marcados con DAPI y células inmunoteñidas con IBA-1 para mPFC (A), OFC (B) y M2 (C). La superposición de DAPI e IBA-1 se muestran para los grupos de control (CTL), DIA y FFR. Barra de escala = 50 μ m. El cociente IBA-1+ / DAPI se muestra para cada grupo experimental y cada región de la corteza prefrontal. Las barras muestran el error estándar. * p <0.05; ** p <0,01; *** p <0,001 vs control.

7.4 DIA Y FFR INCREMENTAN LA DENSIDAD DE LA MICROGLIA DE-RAMIFICADA.

La microglía presenta distintos fenotipos que pueden ser identificados con base en su morfología. El fenotipo reactivo, por ejemplo, se caracteriza por una reducción en la longitud de sus procesos y un aumento en el diámetro del soma, que corresponde a una morfología de-ramificada. En consecuencia, se evaluó el efecto de la anorexia sobre la morfología de la microglía con un análisis automatizado que estimó el área, perímetro, endpoints y longitud de procesos en la mPFC, la OFC y la M2. Los resultados en la mPFC mostraron que el área de la microglía disminuyó significativamente en los grupos experimentales DIA (-57%) y FFR (-45%) en comparación con el control ($F_{(2, 132)} = 243.86865$, $p < 0.0001$; $n = 7$) (Figura 10A y Tabla 1). En la OFC también se observó una disminución en el área de la microglía de los grupos DIA (-42%) y FFR (-55%) ($F_{(2, 132)} = 50.31867$, $p < 0.0001$; $n=6$) (Figura 10B y Tabla 1). No obstante, no se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales para la M2 ($F_{(2, 132)} = 0.07637$; $p = 0.45$) (Figura 10C y Tabla 1).

El perímetro se redujo significativamente en los grupos DIA (-64%) y FFR (-51%) en la mPFC ($F_{(2, 171)} = 244.99354$; $n=7$; $p < 0.0001$) (Figura 10A y Tabla 1). Para la OFC, el perímetro también disminuyó significativamente en los grupos DIA (-56%) y FFR (-49%) ($F_{(2, 171)} = 83.23503$; $p < 0.0001$; $n = 6$) (Figura 10B y Tabla 1). No obstante, no se observaron cambios significativos entre los grupos en la M2 ($F_{(2, 177)} = 0.90435$; $p = 0.31$; $n = 7$) (Figura 11C y Tabla 1).

La longitud total de los procesos también disminuyó significativamente en la mPFC de los grupos DIA (-89%) y FFR (-65%) ($F_{(2, 171)} = 67.21064$; $p < 0.0001$; $n = 7$) (Figura

10A y Tabla 1). En la OFC se observó una disminución similar en DIA (-64%) y en FFR (-37%) ($F_{(2, 171)} = 26.29053$; $p < 0.0001$; $n = 6$) (Figura 11B y Tabla 1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la M2 ($F_{(2, 174)} = 0.76332$; $p = 0.45$; $n = 7$) (Figura 10C y Tabla 1).

El número de endpoints disminuyó significativamente en la mPFC de los grupos DIA (-40%) y FFR (-49%) ($F_{(2, 171)} = 56.38472$; $p < 0.0001$; $n = 7$) (Figura 10A y Tabla 1). En la OFC también se observó una disminución en el número de endpoints para los grupos DIA (-46%) y FFR (-41%) ($F_{(2, 171)} = 35.93821$; $p < 0.0001$; $n = 6$) (Figura 10B y Tabla 1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la M2 ($F_{(2, 174)} = 0.2342$; $p = 0.5567$; $n = 7$) (Figura 10C y Tabla 1).

Finalmente, se cuantificó el número de procesos, los cuales disminuyeron en la mPFC de los grupos DIA (-51%) y FFR (-44%) ($F_{(2, 171)} = 66.32958$; $p < 0.0001$; $n = 7$) (Figura 10A y Tabla 1). En la OFC también se observó una disminución significativa del número de procesos en los grupos DIA (-59%) y FFR (-55%) ($F_{(2, 171)} = 45.23848$; $p < 0.0001$; $n = 6$) (Figura 10B y Tabla 1). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la M2 ($F_{(2, 174)} = 0.24967$; $p = 0.95$; $n = 7$) (Figura 10C y Tabla 1).

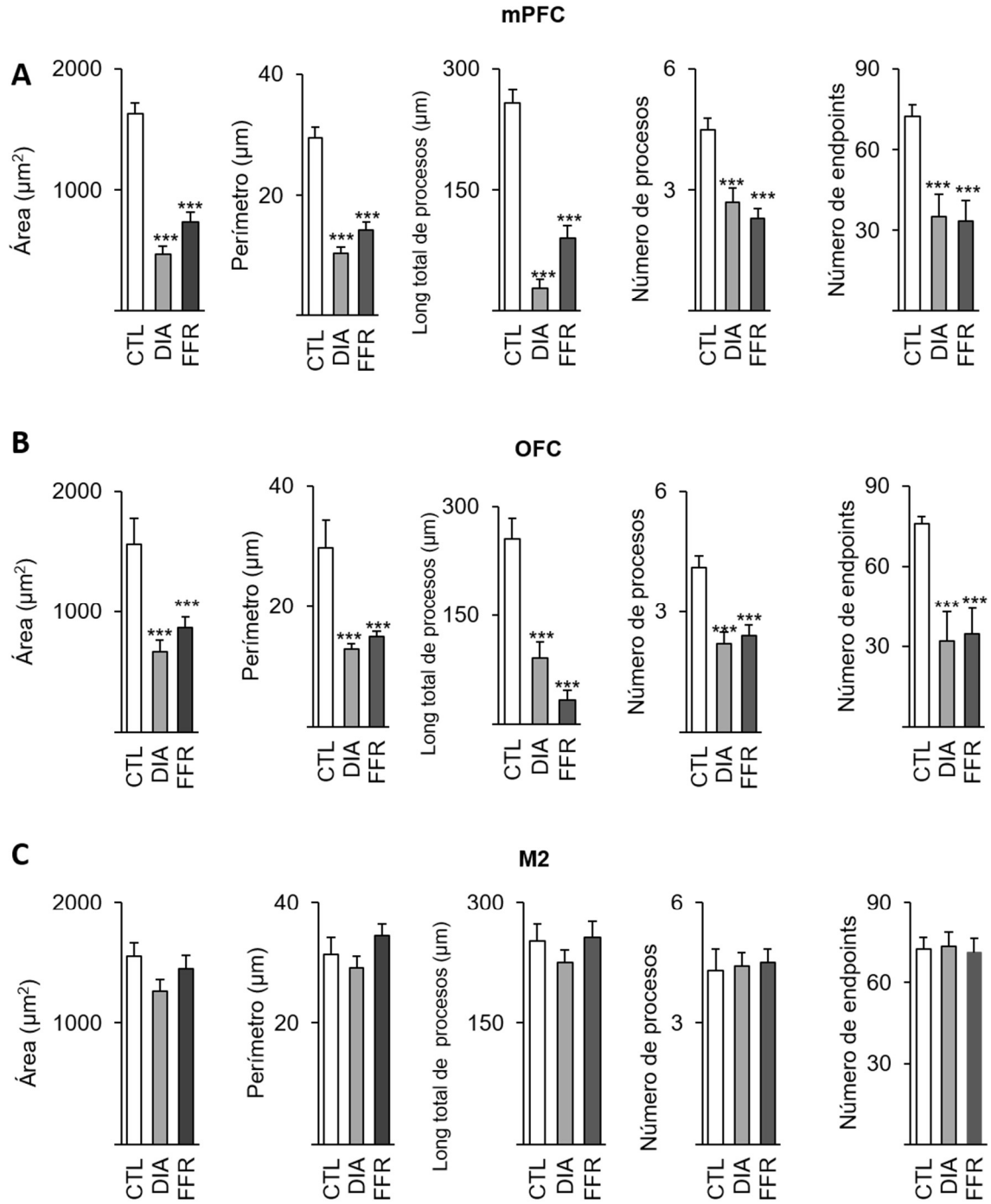


Figura 10. DIA y FFR reducen el tamaño de las células microgliales, la complejidad y la longitud total de sus procesos/ramificaciones. Se muestran los parámetros morfológicos estimados para cada grupo experimental: área, perímetro, longitud total de los procesos, número de procesos y endpoints, en mPFC (A), OFC (B) y M2 (C). Las barras muestran el error estándar. *** p < 0,001 vs control.

7.5 DIA Y FFR INCREMENTAN EL COCIENTE MICROGLÍA DE-RAMIFICADA/RAMIFICADA

Con base en este análisis morfológico se realizó un análisis de clusters K-mean y se identificaron 4 fenotipos de microglía: ramificado +, ramificado, de-ramificado y de-ramificado + (Figura 11A y Tabla 1). La proporción de los 4 fenotipos de microglía en el grupo control fue similar para las tres regiones de la PFC: mPFC (ramificado+: 56%, ramificado: 22%, de-ramificado: 14%, de-ramificado+: 8%), OFC (ramificado+: 54%, ramificado: 24%, de-ramificado: 8%, de-ramificado+: 14%) y M2 (ramificado+: 53%, ramificado: 24%, de-ramificado: 15%, de-ramificado+: 8%) (Figura 11B y Tabla 1). Sin embargo, en el grupo DIA la proporción del fenotipo de-ramificado se incrementó notablemente en la mPFC (ramificado+: 9%, ramificado: 12%, de-ramificado: 44%, de-ramificado+: 35%) y en la OFC (ramificado+: 14%, ramificado: 12%, de-ramificado: 27%, de-ramificado+: 47%). En la M2 la proporción permaneció similar al control (ramificado+: 46%, ramificado: 37%, de-ramificado: 14%, de-ramificado: 8%) (Figura 11B y Tabla 1). Por último, en FFR se encontró un incremento del fenotipo de-ramificado en la mPFC (ramificado+: 9%, ramificado: 19%, de-ramificado: 31%, de-ramificado+: 41%), y la OFC (ramificado+: 12%, ramificado: 20%, de-ramificado: 34%, de-ramificado+: 34%); mientras que para la M2 la proporción se mantuvo similar al control (ramificado+: 44%, ramificado: 32%, de-ramificado: 18%, de-ramificado+: 6%) (Figura 11B y Tabla 1).

Finalmente se calculó el cociente microglía de-ramificada / microglía ramificada. Los fenotipos de-ramificado y de-ramificado+ se agruparon en la microglía de-ramificada y la microglía ramificada incluyó a los fenotipos ramificado y ramificado+. En la mPFC se observó un incremento significativo del cociente para los grupos DIA (+2515) y FFR (+1592%) (CTL 0.26 ± 0.03 , DIA 6.8 ± 1.3 , FFR 7 ± 0.9 ; $F_{(2, 34)} = 7.56852$; $p = 0.0228$). La OFC también mostró un incremento significativo del cociente microglía de-ramificada/ramificada de 2540% para los grupos DIA (+2540%) y FFR (+2580%) (CTL 0.25 ± 0.04 , DIA 6.6 ± 1.4 , FFR 6.7 ± 1.1 ; $F_{(2, 36)} = 11.02896$; $p = 0.00978$); mientras que en la M2 no se observaron diferencias

significativas entre los grupos (CTL 0.33 ± 0.02 , DIA 0.20 ± 0.01 , FFR 0.24 ± 0.03 ; $F_{(2, 36)} = 4.56578$; $p = 0.21$) (Figura 11B y Tabla 1).

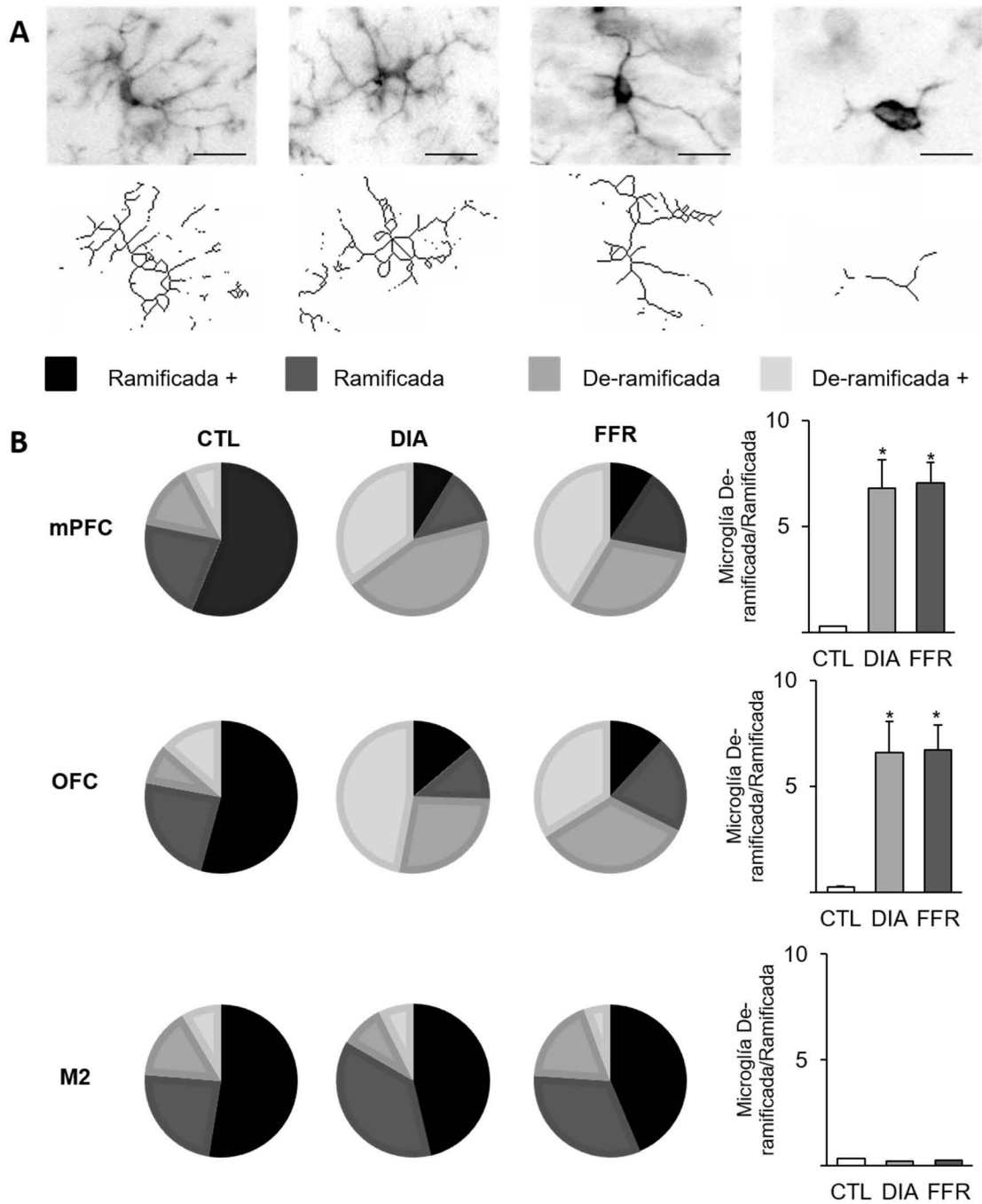


Figura 11. DIA Y FFR incrementan el cociente microglía de-ramificada/ramificada. (A) Se identificaron cuatro fenotipos microgliales con base en el tamaño microglial, la complejidad y el alargamiento de los procesos mediante un análisis de clusters K-mean: ramificado+, ramificado, de-ramificado y de-ramificado+. Barra de escala = 10 mm. (B) Los gráficos circulares para mPFC, OFC y M2 muestran la proporción de los cuatro

fenotipos de microglía para cada grupo experimental (CTL, DIA y FFR). Se muestra la relación de microglía de-ramificada / microglía ramificada. Las barras muestran el error estándar. * p <0.05 vs control.

Tabla 1. Efecto de DIA sobre la microglía

Región de corteza	CTL	DIA	FFR
Núcleo (células por mm ²)			
mPFC	1756 ± 122 (N= 7)	1641 ± 83 (N= 7)	1643 ± 80 (N= 7)
OFC	1893 ± 138 (N= 6)	1951 ± 158 (N= 6)	1896 ± 139 (N= 6)
M2	1386 ± 128 (N= 6)	1388 ± 38 (N= 7)	1388 ± 118 (N= 7)
Microglía (células por mm ²)			
mPFC	154 ± 11 (N= 7)	313 ± 25 (N= 7)***	331 ± 33 (N= 7)***
OFC	185 ± 15 (N= 6)	353 ± 19 (N= 6)***	375 ± 27 (N= 6)***
M2	76 ± 9 (N= 6)	92 ± 10 (N= 7)	89 ± 9 (N= 7)
Cociente microglía/Núcleo			
mPFC	0.09 ± 0.01 (N= 7)	0.20 ± 0.02 (N= 7)**	0.22 ± 0.02(N=7)***
OFC	0.10 ± 0.01 (N=6)	0.20 ± 0.02 (N=6)*	0.21 ± 0.02 (N=6)**
M2	0.05 ± 0.01 (N= 6)	0.07 ± 0.02 (N= 7)	0.06 ± 0.01 (N= 7)
Longitud total de procesos (µm)			
mPFC	258 ± 16 (N=7)	29 ± 11 (N=7)***	90 ± 16 (N=7)***
OFC	255 ± 29 (N=6)	91 ± 11 (N=6)***	34 ± 16 (N=6)***
M2	252 ± 20 (N=6)	224 ± 16 (N=7)	256 ± 20 (N=7)
Área (µm ²)			
mPFC	1629 ± 94 (N=7)	469 ± 65 (N=7)***	735 ± 85 (N=7)***
OFC	1564 ± 207 (N=6)	668 ± 92 (N=6)***	866 ± 91 (N=6)***
M2	1551 ± 111 (N=6)	1262 ± 92 (N=7)	1444 ± 117 (N=7)
Perímetro (µm)			
mPFC	31 ± 3 (N=7)	29 ± 2 (N=7)***	34 ± 2 (N=7)***
OFC	29 ± 2 (N=6)	10 ± 1 (N=6)***	14 ± 1 (N=6)***
M2	4.5 ± 1 (N=6)	13 ± 1 (N=7)	15 ± 1 (N=7)
Número de procesos			
mPFC	4.5 ± 0.2 (N=7)	2.7 ± 0.3 (N=7)***	2.3 ± 0.2 (N=7)***
OFC	4.1 ± 0.2 (N=6)	2.2 ± 0.2 (N= 6)***	2.4 (N=6)***
M2	4.5 ± 1 (N=6)	4.4 ± 0.3 (N= 6)	4.5 ± 0.3 (N= 6)
Número de endpoints			
mPFC	72 ± 4.2 (N=7)	35 ± 8.2 (N=7)***	33 ± 7.9 (N=7)***
OFC	75 ± 2.7 (N=6)	31 ± 10 (N=6)***	34 ± 9 (N=6)***
M2	72 ± 4.3 (N=6)	73 ± 5.3 (N=6)	71 ± 5.2 (N=6)
Cociente Microglía de-ramificada/Ramificada			
mPFC	0.26 ± 0.03 (N=7)	6.81 ± 1.34 (N=7)*	7.06 ± 0.93 (N=7)*
OFC	0.25 ± 0.04 (N=6)	6.6 ± 1.48 (N=6)*	6.71 ± 1.18 (N=6)*
M2	0.33 ± 0.02 (N=6)	0.20 ± 0.01 (N=6)	0.24 ± 0.03 (N=6)

7.6 DIA Y FFR DISMINUYEN LA DENSIDAD DE ASTROCITOS

La densidad de los núcleos y los astrocitos se estimó en la mPFC, la OFC y la M2, con estos valores se obtuvo el cociente astrocito/núcleo. Los resultados en la mPFC mostraron una disminución significativa en el cociente astrocito/núcleo para DIA (-30%) y FFR (-31%) en comparación con el grupo control ($F_{(2, 124)} = 6.20236$; $p = 0.00271$; $n = 5$) (Figura 12A y Tabla 2). En la OFC también se observó una disminución similar para DIA (-52%) y FFR (-49%) ($F_{(2, 22)} = 13.53031$; $p > 0.0001$; $n = 5$) (Figura 12B y Tabla 2); no obstante, en la M2 no se observaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(2, 41)} = 0.77731$; $p = 0.4663$; $n = 5$) (Figura 12C y Tabla 2).

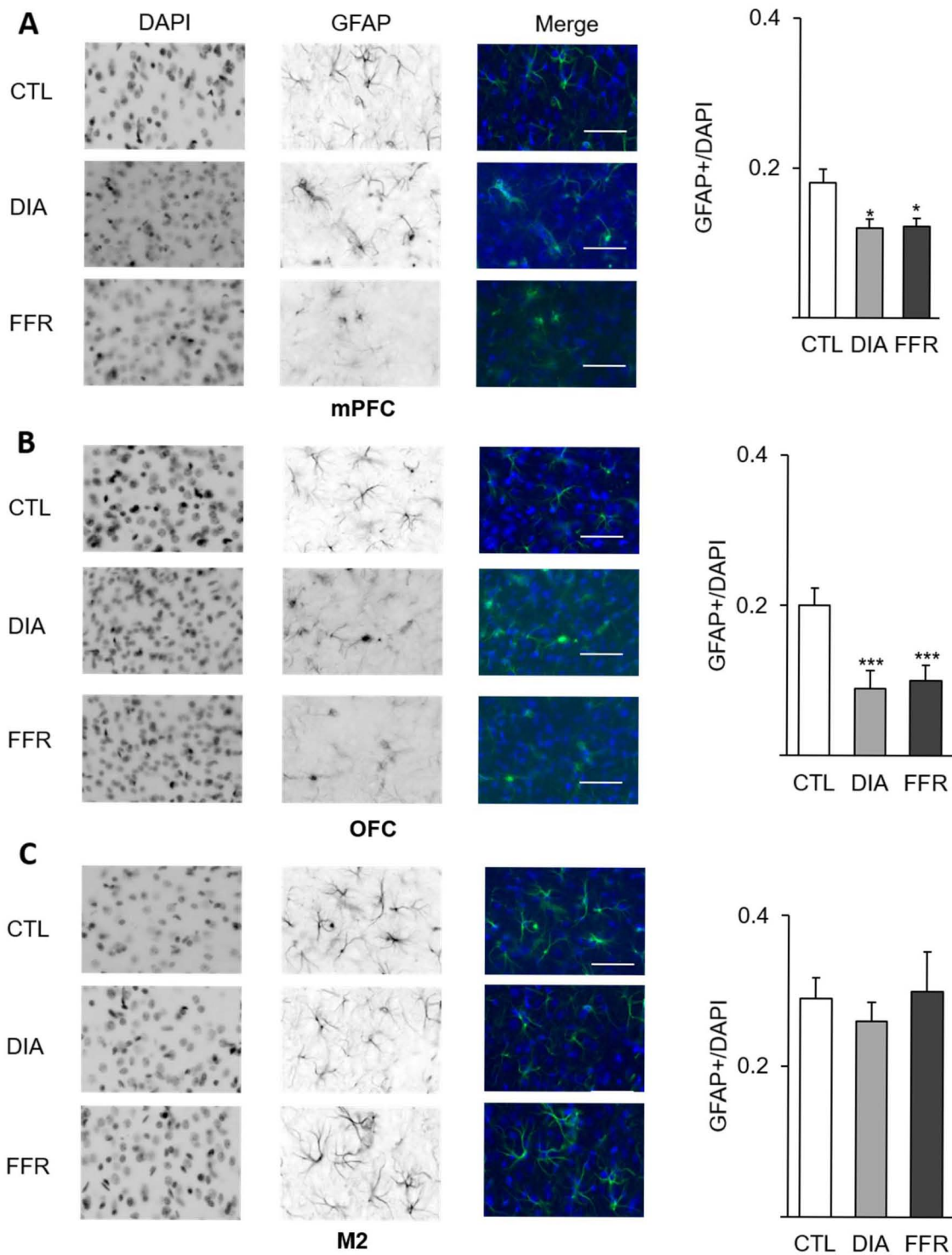


Figura 12. DIA y FFR disminuyen la densidad de los astrocitos. Imágenes representativas de secciones sagitales que contienen la mPFC, la OFC y la M2. Se muestran los núcleos marcados con DAPI y células inmunoreactivas a GFAP en la mPFC (A), la OFC (B) y la M2 (C). La superposición de las imágenes de DAPI y de GFAP se muestra para los grupos de control (CTL), DIA y FFR. Barra de escala = 50 μ m. El cociente GFAP

/ DAPI se muestra para cada grupo experimental y cada región de la PFC. Las barras muestran el error estándar.

* $p < 0.05$; *** $p < 0,001$ vs control.

7.7 DIA Y FFR MODIFICAN LA MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS

El área de los astrocitos de la mPFC disminuyó en los grupos DIA (-11%) y FFR (-10%) en comparación con el control ($F_{(2, 267)} = 8.37967$; $p < 0.0001$; $n = 5$) (Figura 13A y Tabla 2). En la OFC también se observó una disminución del área de los astrocitos en los grupos DIA (-14%) y FFR (-12%) ($F_{(2, 267)} = 5.02215$; $p = 0.00723$; $n = 5$) (Figura 13B y Tabla 2). En la M2 no se observaron cambios significativos entre los grupos ($F_{(2, 267)} = 0.56949$; $p = 0.56949$; $n = 5$) (Figura 13C y Tabla 2).

El perímetro de los astrocitos de la mPFC se redujo en los grupos DIA (-32%) y FFR (-26%) ($F_{(2, 267)} = 6.78859$; $p = 0.00133$; $n = 5$) (Figura 13A y Tabla 2). En la OFC también se observó una disminución significativa en los grupos DIA (-26%) y FFR (-25%) ($F_{(2, 267)} = 5.22116$; $p = 0.00597$; $n = 5$) (Figura 13B y Tabla 2); sin embargo, en la M2 no se observaron cambios significativos entre los grupos ($F_{(2, 267)} = 0.16926$; $p = 0.84438$; $n = 5$) (Figura 13C y Tabla 2).

La longitud total de los procesos de los astrocitos en la mPFC disminuyó en los grupos DIA (-26%) y FFR (-20%) ($F_{(2, 267)} = 6.64419$; $p = 0.00153$; $n = 5$) (Figura 13A y Tabla 2). En los astrocitos de la OFC también se observó una disminución significativa en la longitud total de los procesos para los grupos DIA (-23%) y FFR (-25%) ($F_{(2, 267)} = 5.04318$; $p = 0.00708$; $n = 5$) (Figura 13B y Tabla 2). Los astrocitos de la M2 no presentaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(2, 267)} = 0.0676$; $p = 0.93465$; $n = 5$) (Figura 13C y Tabla 2).

El número de endpoints disminuyó significativamente en los astrocitos de la mPFC para los grupos DIA (-30%) y FFR (-28%) ($F_{(2, 267)} = 12.84498$; $p < 0.0001$; $n = 5$) (Figura 13A y Tabla 2). En los astrocitos de la OFC también disminuyó el número de endpoints significativamente para los grupos DIA (-23%) y FFR (-17%) ($F_{(2, 267)} = 5.22159$; $p = 0.00596$; $n = 5$) (Figura 13B y Tabla 2). Los astrocitos de la M2 no

presentaron diferencias significativas en el número de endpoints entre los grupos experimentales ($F_{(2, 267)} = 0.03971$; $p = 0.96108$; $n = 5$) (Figura 13C y Tabla 2).

El número de procesos se redujo en los astrocitos de la mPFC para los grupos DIA (-55%) y FFR (-57%) ($F_{(2, 267)} = 6.59013$; $p = 0.00161$; $n = 5$) (Figura 13A y Tabla 2). Una disminución similar se observó con los procesos de los astrocitos de la OFC para los grupos DIA (-40%) y FFR (-37%) ($F_{(2, 267)} = 7.31487$; $p > 0.0001$; $n = 5$) (Figura 13B y Tabla 2). Los procesos de los astrocitos de la M2 no presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F_{(2, 267)} = 0.28259$; $p = 0.75405$; $n = 5$) (Figura 13C y Tabla 2).

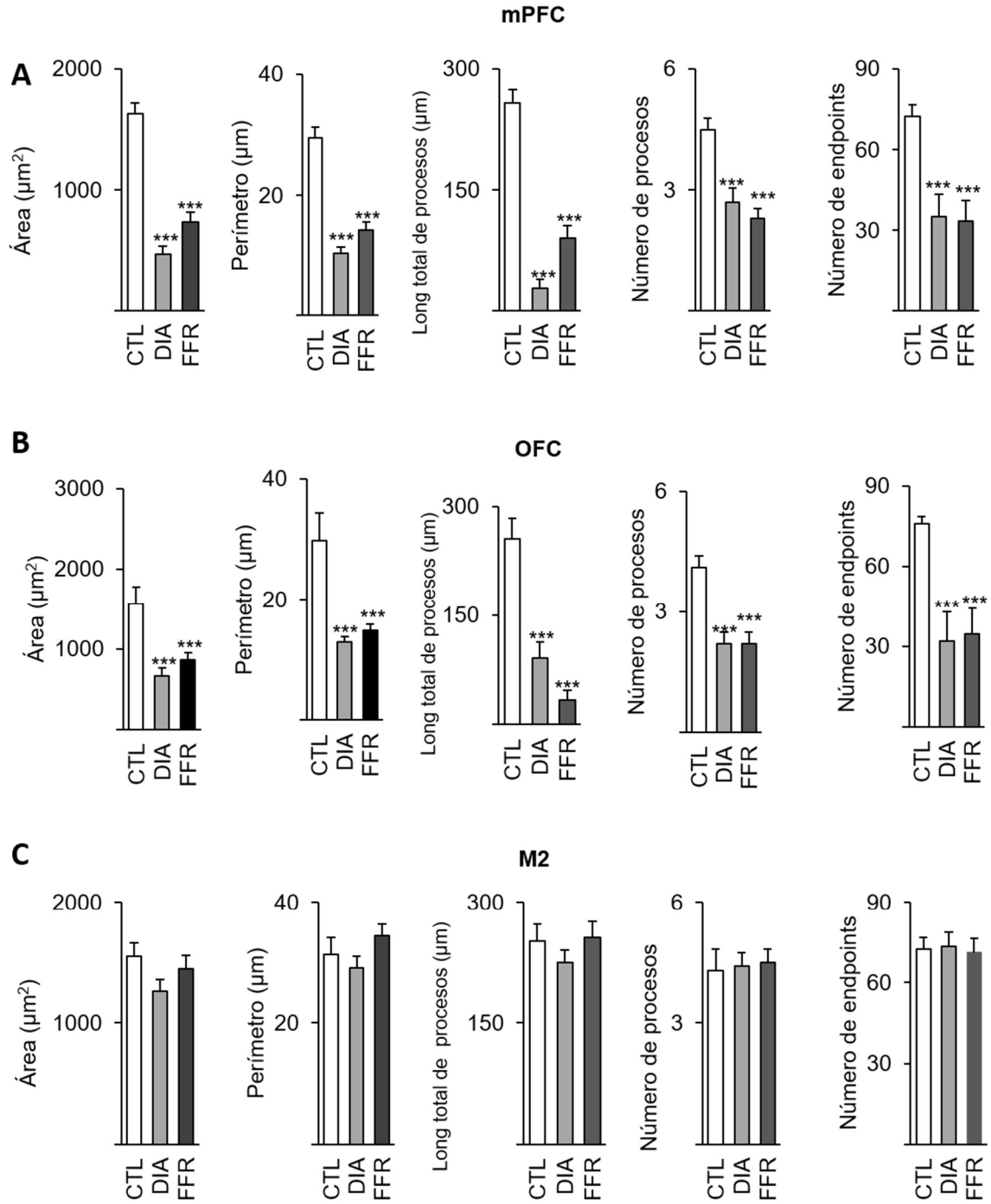


Figura 13. DIA y FFR reducen el tamaño de los astrocitos, la complejidad y la longitud total de los procesos. Se muestran los parámetros morfológicos estimados: área, perímetro, longitud total de los procesos, número de procesos y endpoints en mPFC (A), OFC (B) y M2 (C). Las barras muestran el error estándar. ** p <0,01; *** p <0,001 vs control.

7.8 DIA Y FFR INCREMENTAN EL COCIENTE ASTROCITO DE-RAMIFICADO/RAMIFICADO

Con base en el análisis citomorfológico se realizó un análisis de clusters K-mean y se identificaron 4 fenotipos de astrocitos: ramificado+, ramificado, de-ramificado y de-ramificado+ (Figura 14A y Tabla 2). La proporción de los 4 fenotipos fue similar en las tres regiones de la PFC analizadas en el grupo control: la mPFC (ramificado+: 39%, ramificado: 38%, de-ramificado: 14%, de-ramificado+: 9%), la OFC (ramificado+: 41%, ramificado: 30%, de-ramificado: 19%, de-ramificado+: 10%) y la M2 (ramificado+: 39%, ramificado: 26%, de-ramificado: 17%, de-ramificado+: 18%) (Figura 14B y Tabla 2). Sin embargo, la proporción del fenotipo de-ramificado se incrementó en DIA para la mPFC (ramificado+: 10%, ramificado: 14%, de-ramificado: 38%, de-ramificado+: 38%) y la OFC (ramificado+: 13%, ramificado: 12%, de-ramificado: 36%, de-ramificado+: 39%); mientras que para la M2 la permaneció similar al control (ramificado+: 40%, ramificado: 37%, de-ramificado: 11%, de-ramificado: 12%) (Figura 14B y Tabla 2). En el grupo experimental FFR también se observó el incremento del fenotipo de-ramificado en la mPFC (ramificado+: 17%, ramificado: 8%, de-ramificado: 37%, de-ramificado+: 38%), y la OFC (ramificado+: 17%, ramificado: 5%, de-ramificado: 40%, de-ramificado+: 38%); mientras que para la M2 la proporción se mantuvo similar al control (ramificado+: 39%, ramificado: 35%, de-ramificado: 13%, de-ramificado+: 13%) (Figure 14B y Tabla 2). Finalmente se calculó el cociente astrocito de-ramificado / astrocito ramificado, considerando como astrocitos de-ramificados a los fenotipos de-ramificado y de-ramificado+; mientras que los astrocitos ramificados incluyeron los fenotipos ramificado y ramificado+. El cociente de astrocitos de-ramificados/ramificados de la mPFC aumentó en los grupos DIA (+1003%) y FFR (+968%) (CTL 0.29 ± 0.02 , DIA 3.2 ± 0.3 , FFR 3.1 ± 0.9 ; $F_{(2, 27)} = 33.64789$; $p < 0.0001$). De manera similar, el cociente estimado para la OFC mostró un incremento para los grupos DIA (+661) y FFR (+733%) (CTL 0.42 ± 0.09 , DIA 3.2 ± 0.54 , FFR 3.54 ± 0.09 ; $F_{(2, 27)} = 18.38933$; $p = 0.00276$); mientras que para la M2 no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (CTL $0.52 \pm$

0.02, DIA 0.30 ± 0.06 , FFR 0.36 ± 0.06 ; $F_{(2, 27)} = 2.89168$; $p = 0.103202$) (Figura 14B y Tabla 2).

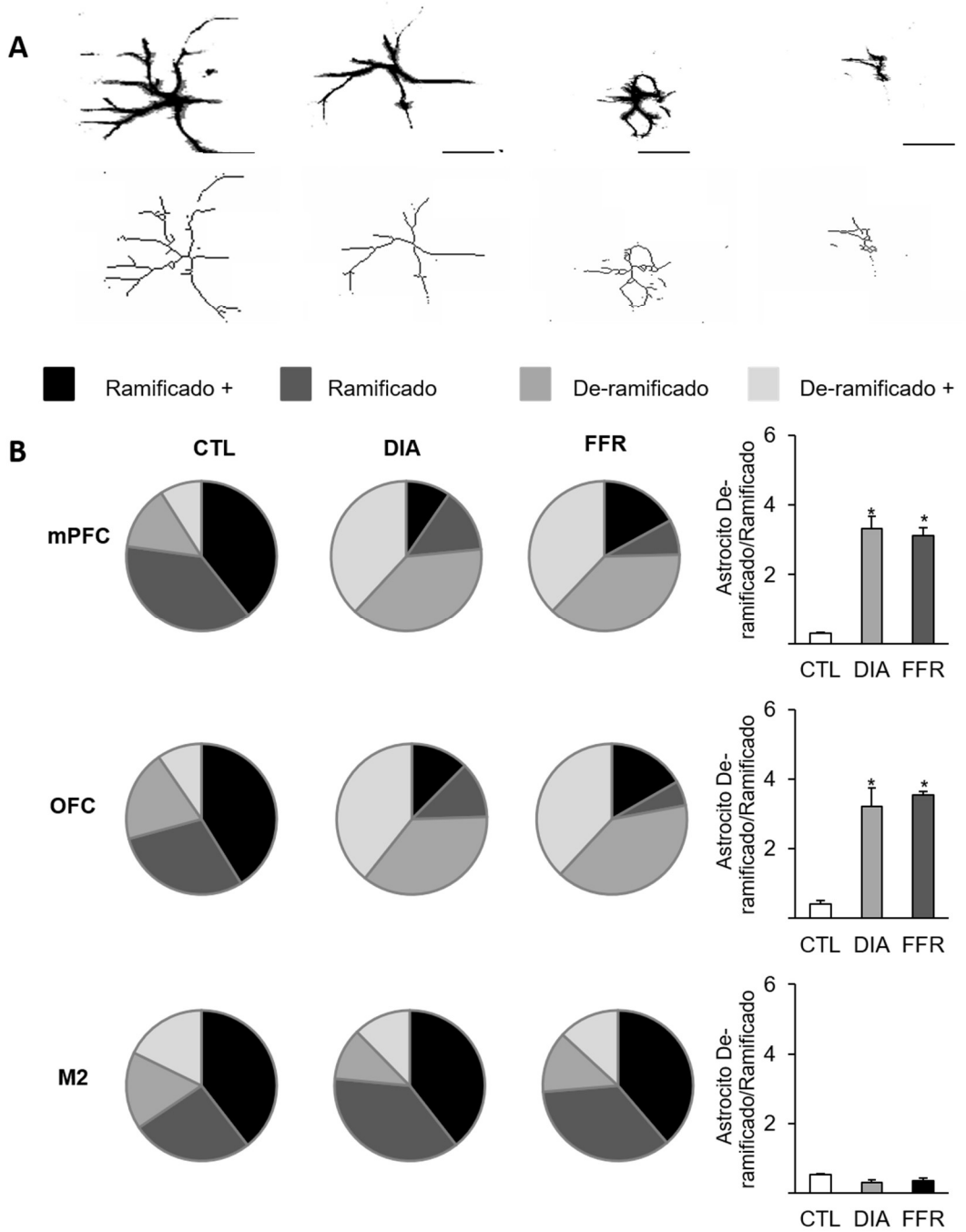


Figura 14. DIA y FFR incrementan el cociente astrocito de-ramificado/ramificado. (A) Se identificaron cuatro fenotipos de astrocitos con base en el tamaño, la complejidad y el alargamiento de los procesos de los astrocitos mediante el análisis de clusters K-mean: ramificado +, ramificado, de-ramificado y de-ramificado+. Barra de escala = 20 μ m. (B) Los gráficos circulares para la mPFC, la OFC y la M2 muestran la proporción de los cuatro fenotipos para cada grupo experimental (CTL, DIA y FFR). (C) Se muestra la relación de astrocito de-ramificado / ramificado. Las barras son el promedio de los datos \pm el error estándar. * $p < 0.05$ vs control.

Tabla 2. Efecto de DIA sobre los astrocitos

Región de corteza	CTL	DIA	FFR
Núcleo (células por mm ²)			
mPFC	1831 ± 94 (N=5)	1768 ± 61 (N=5)	1665 ± 55 (N= 7)
OFC	1963 ± 210 (N=5)	1783 ± 120 (N=5)	1724 ± 103 (N= 6)
M2	1629 ± 81 (N= 5)	1702 ± 75 (N= 5)	1540 ± 63 (N= 7)
Astrocito (células por mm ²)			
mPFC	342 ± 35 (N=5)	229 ± 26 (N= 5)*	215 ± 23 (N= 5)*
OFC	396 ± 23 (N=5)	171 ± 22 (N= 5)**	176 ± 31 (N= 5)***
M2	480 ± 28 (N=5)	452 ± 29 (N= 5)	464 ± 21 (N= 5)
Cociente astrocito/Núcleo			
mPFC	0.18 ± 0.01 (N=5)	0.12 ± 0.01 (N= 5)**	0.12 ± 0.01(N=5)**
OFC	0.20 ± 0.02 (N=5)	0.09 ± 0.02 (N=5)*	0.10 ± 0.02 (N=5)*
M2	0.29 ± 0.02 (N=5)	0.26 ± 0.02 (N= 5)	0.30 ± 0.05 (N= 5)
Longitud total de procesos (µm)			
mPFC	905 ± 44.7 (N=5)	662 ± 50.5 (N=5)***	721 ± 50.6 (N=5)***
OFC	909 ± 58.7 (N=5)	693 ± 57.1 (N=5)**	680 ± 55.1 (N=5)**
M2	909 ± 40 (N=5)	930 ± 41 (N=5)	925 ± 40 (N=5)
Área (µm ²)			
mPFC	2384 ± 44 (N=5)	2092 ± 64 (N=5)***	2105 ± 44 (N=5)***
OFC	2384 ± 44 (N=5)	2034 ± 108 (N=5)**	2087 ± 84 (N=5)**
M2	2462 ± 94 (N=5)	2490 ± 96 (N=5)	2597 ± 116 (N=5)
Perímetro (µm)			
mPFC	62 ± 4.6 (N=5)	41 ± 3.6 (N=5)***	45 ± 3.9 (N=5)***
OFC	65 ± 4.6 (N=5)	47 ± 4.2 (N=5)***	49 ± 3.9 (N=5)***
M2	65 ± 5.9 (N=5)	68 ± 5.9 (N=5)	70 ± 5.9 (N=5)
Número de procesos			
mPFC	18 ± 3.7 (N=5)	8 ± 0.54 (N=5)***	7 ± 1.2 (N=5)***
OFC	18 ± 2.3 (N=5)	11 ± 0.9 (N= 5)**	11 ± 0.8 (N=5)**
M2	18 ± 3.7 (N=5)	22 ± 2.7 (N= 5)	20 ± 3.2 (N= 5)
Número de endpoints			
mPFC	39 ± 2.1 (N=5)	27 ± 1.8 (N=5)***	28 ± 1.45 (N=5)***
OFC	40 ± 2.2 (N=5)	31 ± 1.8 (N=5)**	33 ± 2.2 (N=5)**
M2	36 ± 3.2 (N=5)	36 ± 3.1 (N=5)	35 ± 3.3 (N=5)
Cociente astrocito de-ramificado/ramificado			
mPFC	0.29 ± 0.02 (N=5)	3.2 ± 0.3 (N=5)*	3.1 ± 0.9 (N=5)*
OFC	0.42 ± 0.09 (N=5)	3.2 ± 0.54 (N=5)*	3.5 ± 0.9 (N=5)*
M2	0.52 ± 0.02 (N=5)	0.30 ± 0.06 (N=5)	0.36 ± 0.06 (N=5)

7.9 DIA Y FFR INCREMENTAN LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS TNF- α , IL-6 E IL-1 β

La morfología de la microglía y los astrocitos sugiere un fenotipo reactivo por lo que el siguiente objetivo fue investigar el efecto de DIA sobre la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β , esto se investigó por medio de Western blot. Los resultados mostraron el incremento significativo en la expresión de TNF- α en los grupos DIA (+98%) y FFR (+81%) en comparación con el control ($F_{(2,6)} = 267.84167$, $p < 0.0001$). La expresión de IL-6 también se incrementó para los grupos DIA (+85%) y FFR (+69%) en comparación con el control ($F_{(2,6)} = 136.26812$, $p < 0.0001$). Finalmente, la expresión de IL-1 β también se incrementó significativamente en los grupos DIA (+70%) y FFR (+50%) con respecto al control ($F_{(2,6)} = 47.34697$, $p < 0.0001$) (Figura 15).

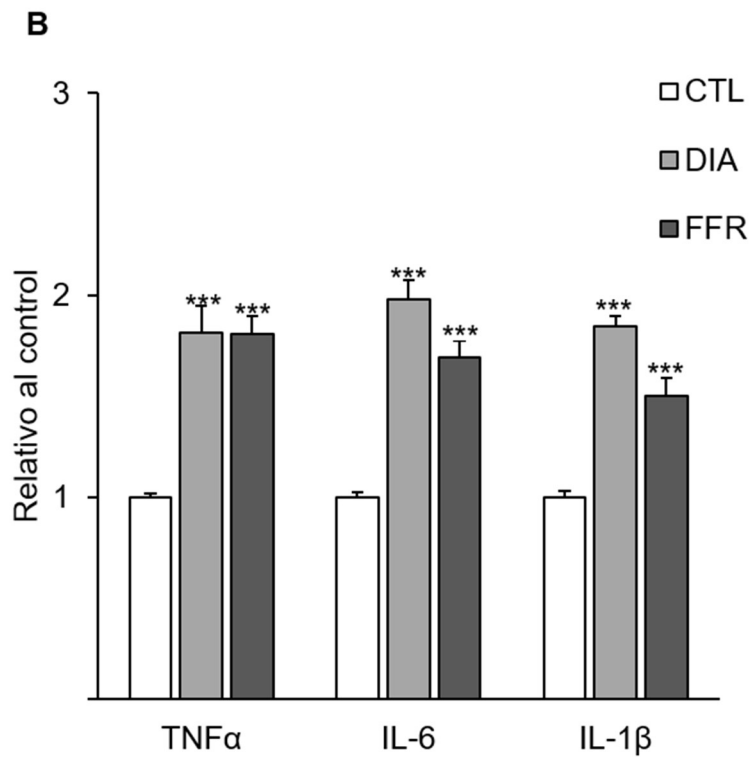
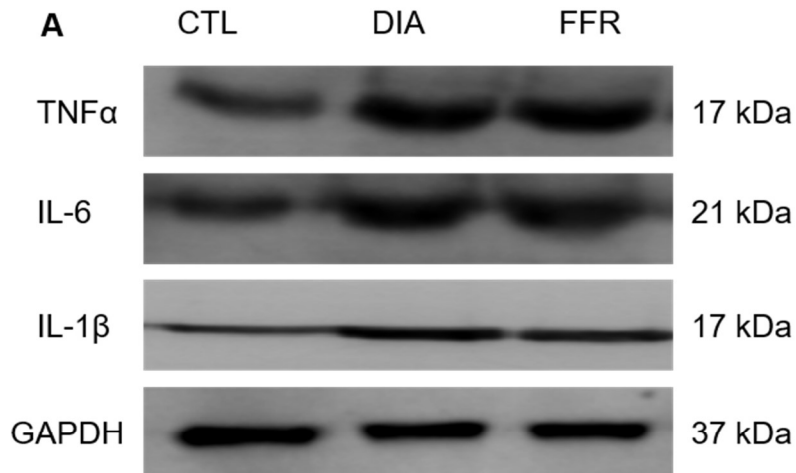


Figura 15. DIA y FFR incrementan la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . A) imagen representativa de western blot para TNF- α , IL-6 e IL-1 β . GAPDH se utilizó como control de carga (n = 3). B) Densitometría de las bandas correspondientes a TNF- α , IL-6 e IL-1 β normalizada con relación a su control. Las barras representan el promedio \pm el error estándar. *** p < 0.001 vs control.

7.10 DIA Y FFR PROMUEVEN NEURODEGENERACIÓN

La evidencia experimental del presente estudio sugiere que la anorexia induce un ambiente pro-inflamatorio asociado a la glía reactiva. Nuestro siguiente objetivo fue determinar si este ambiente promueve neurodegeneración. Por ello se realizaron estudios de doble inmunofluorescencia, para estimar el número de células FJC NeuN+ por mm². Los resultados mostraron el aumento en el número de células FJC NeuN+ por mm² para los grupos DIA (+5833%) y FFR (+3405%) en comparación con el grupo control en la mPFC ($F_{(2, 47)} = 15.524$; $p < 0.0001$; $n = 4$) (Figura 16A y Tabla 3). En la OFC sucede algo similar, DIA incrementó el número de células FJC NeuN+ por mm² en DIA (+7898%) y FFR (+2934%) ($F_{(2, 21)} = 7.08$; $p = 0.001$; $n = 4$) (Figura 16B y Tabla 3). Por otro lado, en la M2 no se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales ($F_{(2, 11)} = 0.111$; $p = 0.896$; $n = 4$) (Figura 16C y Tabla 3). Adicionalmente, se estimó el porcentaje de células FJC NeuN+ con relación al total de neuronas. En la mPFC las neuronas FJC NeuN+ corresponden al 1% en el CTL, al 21% en DIA y al 13% en FFR (Figura 16A y Tabla 3). En la OFC las células FJC/NeuN+ corresponden al 1% en el CTL, al 30% en el grupo DIA y 12% en grupo FFR (Figura 16B y Tabla 3); mientras que en la M2 los porcentajes son similares entre los tres grupos experimentales (Figura 16C y Tabla 3).

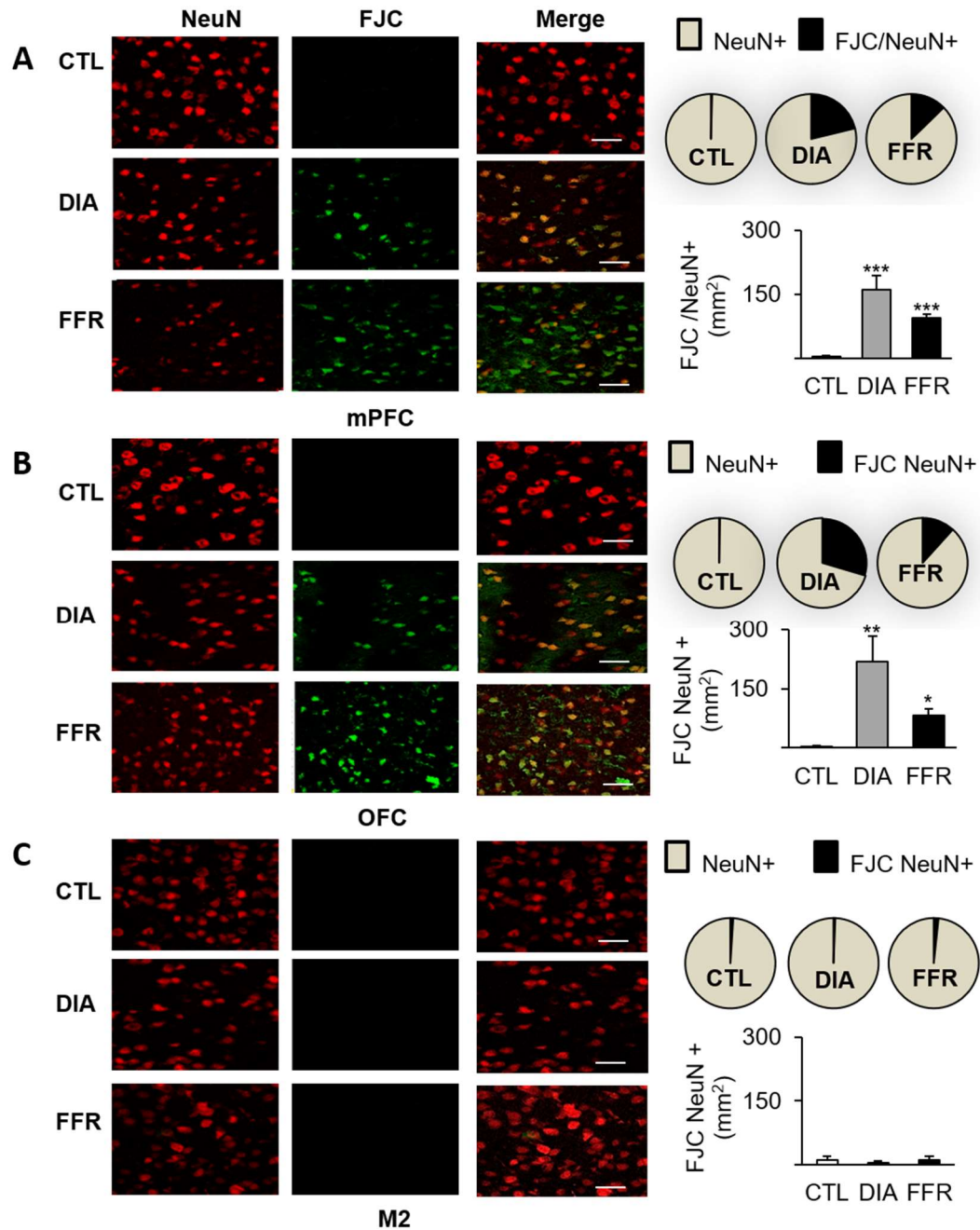


Figura 16. DIA y FFR promueven neurodegeneración. Se muestra una imagen representativa de la inmunofluorescencia contra NeuN y la tinción con Fluoro-jade C (FJC) en la mPFC (A), la OFC (B) y la M2 (C). La superposición de NeuN y FJC se muestra para los grupos de control (CTL), DIA y FFR. Barra de escala = 50 μ m. El número de células FJC/NeuN+ por mm² se calculó para cada una de las tres regiones analizadas, así como el porcentaje correspondiente de las células FJC NeuN+ del total de neuronas. Las barras representan el promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs control.

Tabla 3. Efecto de DIA sobre la neurodegeneración

	mPFC	OFC	M2
Control (células por mm ²)			
FJC+ (Total)	6 ± 2 (N =4)	6 ± 3 (N =4)	17 ± 9 (N =4)
FJC+ NeuN +	4 ± 2 (N =4)	3 ± 2 (N =4)	11 ± 9 (N =4)
FJC + NeuN -	2 ± 0.34 (N =4)	3 ± 0.59 (N =4)	6 ± 0.79 (N =4)
DIA (células por mm ²)			
FJC+ (Total)	257 ± 47 (N =4)***	252 ± 68 (N =4)***	22 ± 14 (N =4)
FJC+ NeuN +	162 ± 32 (N =4)***	218 ± 64 (N =4)**	5 ± 1 (N =4)
FJC + NeuN -	95 ± 37 (N =4)*	33 ± 13 (N =4)*	17 ± 4 (N =4)
FFR (células por mm ²)			
FJC+ (Total)	248 ± 27 (N =4)**	203 ± 33 (N =4)*	28 ± 14 (N =4)
FJC+ NeuN +	94 ± 9 (N =4)***	81 ± 17 (N =4)**	11 ± 9 (N =4)
FJC + NeuN -	154 ± 29 (N =4)**	122 ± 31 (N =4)**	17 ± 4 (N =4)

8. DISCUSIÓN

El término anorexia describe cualquier pérdida de apetito y reducción concomitante en la ingesta de alimentos, esta puede ser patológica o ser una respuesta a ciertos desafíos homeostáticos (Watts & Boyle, 2010). En este trabajo, se utilizó un modelo de anorexia adaptativa conocido como anorexia inducida por deshidratación. Nuestros resultados mostraron que la anorexia promueve: 1) el incremento en la expresión del marcador microglial IBA-1 y de los marcadores de astrocitos vimentina y nestina, así como la reducción en la expresión de GFAP. 2) El aumento en la densidad de los fenotipos de-ramificados para la microglía y los astrocitos. 3) El incremento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias: TNF- α , IL-6 e IL-1 β . 4) Este ambiente pro-inflamatorio correlacionó con neurodegeneración.

El aumento en la densidad de la microglía y el predominio de la microglía de-ramificada en DIA y FFR, sugieren que la disminución en el consumo de alimento ya sea voluntario o impuesto, promueve un fenotipo reactivo específicamente para la mPFC y la OFC, ya que no se observaron cambios en la M2. La densidad de microglía que se estimó para la mPFC y la OFC coincide con lo reportado en trabajos anteriores para el grupo control (Zhang *et al.*, 2018). Para la M2 se estimó una densidad de microglía menor a la observada en la mPFC y la OFC, curiosamente la densidad de la microglía en esta región se desconoce (Keller *et al.*, 2018), sin embargo, estudios previos mostraron que la densidad de la microglía es

heterogénea en el cerebro (Savchenko *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2020). Las estimaciones de los parámetros morfológicos estimados para la microglía (la longitud total de procesos, el número de endpoints, el total de procesos, el área y perímetro) coinciden con lo reportado anteriormente (Kongsui *et al.*, 2014). La anorexia promueve la disminución de estos cinco parámetros lo que sugiere un fenotipo reactivo. Adicionalmente el análisis de clusters K-mean nos permitió identificar 4 fenotipos para la microglía, lo cual también coincide con lo reportado anteriormente para la corteza prefrontal (Kongsui *et al.*, 2014).

A continuación, se investigó si la anorexia también promovía un fenotipo reactivo para los astrocitos. La anorexia disminuyó los mismos parámetros morfológicos en los astrocitos al igual que en la microglía; también se observó un incremento en la expresión de vimentina y nestina; mientras que la expresión de GFAP se redujo. Estos resultados concuerdan con las características que identifican un fenotipo reactivo: un incremento en la densidad, incremento en la expresión de GFAP, vimentina y nestina e hipertrofia del soma y los procesos (Kang & Hébert, 2011; K. Li *et al.*, 2019; Morizawa *et al.*, 2017). La disminución en la expresión de GFAP concuerda con lo reportado previamente en el modelo de anorexia basada en actividad (ABA), en donde se observó que la densidad de los astrocitos se redujo significativamente en la corteza cerebral (Frintrop *et al.*, 2017). Adicionalmente, la restricción de la ingesta calórica también reduce la expresión de GFAP (Naik *et al.*, 2017; Sridharan *et al.*, 2013). En nuestro estudio se encontró que la vimentina y la nestina incrementan su expresión en DIA y FFR. La disminución en la expresión de GFAP no impide la formación de astrocitos reactivos, ya que los ratones que carecen de la expresión de esta proteína tienen la capacidad de formar astrocitos reactivos que son inmunopositivos a vimentina y nestina (Pekny *et al.*, 1998). Además de esto, se sabe que GFAP no es el mejor marcador de astrocitos en la corteza prefrontal (Zhang *et al.*, 2019). Por lo que, faltaría corroborar si realmente la densidad de los astrocitos disminuye, ya que el método de cuantificación podría subestimar el número real de astrocitos al no considerar aquellos que son GFAP negativos pero que son vimentina/nestina positivos o bien, los astrocitos que no

estén siendo marcados con GFAP. La densidad de astrocitos por mm² en la PFC y la OFC coincide con lo reportado en trabajos anteriores para el grupo control (Gosselin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2019), la densidad de astrocitos M2 varían entre la mPFC y la OFC, lo que apoya la hipótesis de que la densidad de los astrocitos tiene una distribución heterogénea en el cerebro (Olude *et al.*, 2015). De manera similar, la longitud total de los procesos, los endpoints, el total de procesos, el área (Johnson, Breedlove, y Jordan 2008) y el perímetro de los astrocitos concuerdan con lo reportado anteriormente (Gumenyuk *et al.*, 2017), lo que corrobora nuestras estimaciones reportadas para el grupo control y valida nuestros datos experimentales para los grupos DIA y FFR. En conjunto, nuestros resultados indican que DIA y FFR incrementa significativamente el fenotipo de-ramificado, lo que sugiere que la anorexia promueve un fenotipo reactivo.

La neuroinflamación se define como una respuesta inflamatoria dentro del cerebro o la médula espinal. Esta inflamación está mediada por la producción de citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y mensajeros secundarios. Estos mediadores son producidos principalmente por la glía del SNC residente (microglía y astrocitos) (DiSabato *et al.*, 2016). El incremento en la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sugiere un proceso neuroinflamatorio en la PFC. Aunque no se conoce si los pacientes con anorexia nervosa muestran un proceso inflamatorio en la PFC, los niveles de TNF- α , IL-6, IL-1 β están incrementados en el suero, lo que sugiere que la anorexia podría estar relacionada con un proceso inflamatorio (Solmi *et al.*, 2015).

Fluoro-Jade es un fluorocromo derivado de fluoresceína que se une específicamente a las neuronas dañadas. Debido a esta característica, se usa comúnmente para la detección histoquímica y la cuantificación de la neurodegeneración (Gutiérrez *et al.*, 2018). La neurodegeneración se define como la pérdida de estructura o función de las células del cerebro (Crews, 2008). En distintas enfermedades se han identificado dos etapas de neurodegeneración denominadas temprana y tardía (Cordeiro *et al.*, 2010; Zilberter & Zilberter, 2017), ambas etapas son reveladas con el FJC (Santos *et al.*, 2012; Schumm *et al.*, 2020).

Con base en esta información, el aumento de células FJC+ en DIA y FFR no necesariamente se traduce en muerte neuronal (Gorman, 2008), ya que la neurodegeneración temprana puede revertirse (Geske *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2007). Nuestros resultados concuerdan con lo observado en estudios post mortem de pacientes diagnosticados con anorexia nervosa en donde se encontraron signos de degeneración en las neuronas corticales (Neumärker *et al.*, 1997). Aunque no sabemos que es lo que inicia el proceso neuroinflamatorio en la mPFC y la OFC, distintos estudios han reportado que estas regiones son especialmente sensibles a la hipoglucemia (Hurst *et al.*, 2012; Lyoo *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2016; Tkacs *et al.*, 2005), lo que podría promover un proceso neuroinflamatorio (Winkler *et al.*, 2019; Won *et al.*, 2012). No obstante, se requieren estudios adicionales para conocer si la neurodegeneración es reversible o si hay muerte neuronal cuando los animales se recuperan de la anorexia, algo experimentalmente posible de realizar en el modelo DIA, ya que con solo sustituir la solución salina por agua los sujetos experimentales recuperan el apetito (Watts, 1998).

El proceso neuroinflamatorio y la neurodegeneración, se observaron específicamente en la mPFC y la OFC regiones cerebrales implicadas en el circuito de recompensa a los alimentos (Horst & Laubach, 2013; Zald, 2009). Ambos procesos pueden alterar la comunicación entre los circuitos neuronales (Schumm *et al.*, 2020). Adicional a esto, anteriormente se describió que la actividad sincrónica de los conjuntos neuronales de la OFC, la IC, AMY la amígdala y el NAc es necesaria para que los animales decidan ir a consumir alimento (Gutierrez *et al.*, 2010), mientras que mPFC puede inhibir o promover la ingesta de alimentos (Land *et al.*, 2014; Prado *et al.*, 2016), por lo que una alteración de las neuronas de la mPFC y OFC podría explicar la disminución en la ingesta de alimentos de los animales con DIA. Estos resultados en conjunto con las alteraciones estructurales y funcionales en mPFC y OFC de pacientes con anorexia nervosa (Frank *et al.*, 2013; Mühlau *et al.*, 2007; Uher *et al.*, 2004), fortalecen la hipótesis de que alteraciones en estas regiones podrían promover la anorexia y contribuir a la recaída de esta enfermedad (Frank, 2013).

El grupo DIA y FFR de este modelo presentan las mismas características endócrinas y neuropeptidérgicas que normalmente se observan en la restricción calórica: como el aumento de la concentración sérica de corticosterona, la disminución en la concentración de leptina e insulina, en ARC hay aumento en la expresión de NPY y disminución en la expresión de POMC y neurotensina (Watts *et al.*, 1999). En este trabajo, observamos resultados similares entre los grupos DIA y FFR (incremento en la expresión del marcador microglial IBA-1 y de los marcadores de astrocitos vimentina y nestina, así como una reducción en la expresión de GFAP, el aumento en la densidad de los fenotipos de-ramificados para la microglía y los astrocitos, el incremento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias: TNF- α , IL-6 e IL-1 β). Este ambiente pro-inflamatorio correlacionó con neurodegeneración. A pesar de esto, la diferencia principal entre estos dos grupos es la motivación por la ingesta de alimento, que está inhibida aún en condiciones de equilibrio negativo de energía en el grupo DIA, mientras que FFR comería cantidades semejantes al grupo control si se les ofreciera el alimento. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos neuronales que se activan durante la anorexia para inhibir el consumo de alimento (Gortari, 2009). Hasta ahora, se han encontrado algunas diferencias entre DIA y FFR que podrían ayudar a explicar la inhibición de la ingesta de alimento en DIA: 1) Incremento en la expresión de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el LH en DIA que además correlaciona positivamente con el grado de anorexia que presentan los animales (Watts *et al.*, 1999). 2) DIA muestra incremento de la hormona liberadora de tirotrina TRH en PVN, mientras que en FFR esta se encuentra disminuida (Gortari *et al.*, 2009).

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La anorexia induce un proceso inflamatorio asociado a la glía reactiva que correlaciona con neurodegeneración en la mPFC y la OFC, pero no en la M2.

Este proceso inflamatorio podría extenderse a otras regiones del cerebro relacionadas con la ingesta de alimentos por lo que estudios adicionales podrían aclarar si todas las regiones involucradas están afectadas en la anorexia o solo algunas de ellas. Adicionalmente, habrá que realizar estudios para conocer si este proceso inflamatorio se revierte una vez que las ratas se recuperan de la anorexia.

10. REFERENCIAS

- Adan, R. a. H., Tiesjema, B., Hillebrand, J. J. G., la Fleur, S. E., Kas, M. J. H., & de Krom, M. (2006). The MC4 receptor and control of appetite. *British Journal of Pharmacology*, 149(7), 815-827. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706929>
- Amin, T., & Mercer, J. G. (2016). Hunger and Satiety Mechanisms and Their Potential Exploitation in the Regulation of Food Intake. *Current Obesity Reports*, 5(1), 106-112. <https://doi.org/10.1007/s13679-015-0184-5>
- Anderberg, R. H., Anefors, C., Bergquist, F., Nissbrandt, H., & Skibicka, K. P. (2014). Dopamine signaling in the amygdala, increased by food ingestion and GLP-1, regulates feeding behavior. *Physiology & Behavior*, 136, 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.026>
- Anttila, J. E., Whitaker, K. W., Wires, E. S., Harvey, B. K., & Airavaara, M. (2017). Role of microglia in ischemic focal stroke and recovery: Focus on Toll-like receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 79(Pt A), 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.07.003>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14(3), 351-355. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Aschner, M. (1998). Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *NeuroToxicology*, 19(2), 269-282.
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488(7410), 172-177. <https://doi.org/10.1038/nature11270>
- Atiende IMSS Trastornos Alimenticios con Tratamiento Médico, Psicológico y en Nutrición | Sitio Web «Acercando el IMSS al Ciudadano». (s. f.). Recuperado 8 de abril de 2020, de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201805/114>
- Avena, N. M., & Bocarsly, M. E. (2012). Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: Neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. *Neuropharmacology*, 63(1), 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.010>
- Barson, J. R., Morganstern, I., & Leibowitz, S. F. (2013). *Complementary Roles of Orexin and Melanin-Concentrating Hormone in Feeding Behavior* [Review Article]. *International Journal of Endocrinology*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2013/983964>

- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 278. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Bi, F., Huang, C., Tong, J., Qiu, G., Huang, B., Wu, Q., Li, F., Xu, Z., Bowser, R., Xia, X.-G., & Zhou, H. (2013). Reactive astrocytes secrete Icn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 4069-4074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218497110>
- Birey, F., Kloc, M., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Christoffel, D. J., Chen, T., Frohman, M. A., Robinson, J. K., Russo, S. J., Maffei, A., & Aguirre, A. (2015). Genetic and Stress-Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-like Behaviors through Reduced Secretion of FGF2. *Neuron*, *88*(5), 941-956. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.046>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Broersen, L. M. (2000). *Attentional processes and learning and memory in rats: The prefrontal cortex and hippocampus compared* (B.-P. in B. Research, Ed.; Vol. 126, pp. 79-94). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26008-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26008-1)
- Brooks, S. J., Barker, G. J., O'Daly, O. G., Brammer, M., Williams, S. C. R., Benedict, C., Schiöth, H. B., Treasure, J., & Campbell, I. C. (2011). Restraint of appetite and reduced regional brain volumes in anorexia nervosa: A voxel-based morphometric study. *BMC Psychiatry*, *11*, 179. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-11-179>
- Brown, G. C., & Neher, J. J. (2010). Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Molecular Neurobiology*, *41*(2-3), 242-247. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8105-9>
- Bulik, C. M., Slof-Op't Landt, M. C. T., van Furth, E. F., & Sullivan, P. F. (2007). The genetics of anorexia nervosa. *Annual Review of Nutrition*, *27*, 263-275. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093713>
- BÜTTNER-ENNEVER, J. (1997). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd edn. *Journal of Anatomy*, *191*(Pt 2), 315-317. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.191203153.x>
- Camandola, S. (s. f.). Astrocytes, emerging stars of energy homeostasis. *Cell Stress*, *2*(10), 246-252. <https://doi.org/10.15698/cst2018.10.157>
- Cano, P. J. C., & Marín, M. G. M. (2015). Mecanismos de control de hambre-saciedad y sus diferencias entre anorexia nerviosa y bulimia nerviosa. *Trastornos de la conducta alimentaria*, *21*, 2237-2259.
- Cassaglia, P. A., Hermes, S. M., Aicher, S. A., & Brooks, V. L. (2011). Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats. *The Journal of Physiology*, *589*(Pt 7), 1643-1662. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.205575>
- Cassidy, R. M., & Tong, Q. (2017). Hunger and Satiety Gauge Reward Sensitivity. *Frontiers in Endocrinology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00104>
- Castro, O. W., Furtado, M. A., Tilelli, C. Q., Fernandes, A., Pajolla, G. P., & Garcia-Cairasco, N. (2011). Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status

- epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research*, 1374, 43-55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.012>
- Cekanaviciute, E., & Buckwalter, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(4), 685-701. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>
- Chiu, K., Lau, W. M., Lau, H. T., So, K.-F., & Chang, R. C.-C. (2007). Microdissection of Rat Brain for RNA or Protein Extraction from Specific Brain Region. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 7. <https://doi.org/10.3791/269>
- Coccarello, R. (2019). Anhedonia in depression symptomatology: Appetite dysregulation and defective brain reward processing. *Behavioural Brain Research*, 372, 112041. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112041>
- Coccarello, R., & Maccarrone, M. (2018). Hedonic Eating and the “Delicious Circle”: From Lipid-Derived Mediators to Brain Dopamine and Back. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00271>
- Cordeiro, M. F., Guo, L., Coxon, K. M., Duggan, J., Nizari, S., Normando, E. M., Sensi, S. L., Sillito, A. M., Fitzke, F. W., Salt, T. E., & Moss, S. E. (2010). Imaging multiple phases of neurodegeneration: A novel approach to assessing cell death in vivo. *Cell Death & Disease*, 1(1), e3-e3. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.3>
- Crews, F. T. (2008). Alcohol-related neurodegeneration and recovery: Mechanisms from animal models. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 31(4), 377-388.
- D’Agostino, G., Lyons, D. J., Cristiano, C., Burke, L. K., Madara, J. C., Campbell, J. N., Garcia, A. P., Land, B. B., Lowell, B. B., Dileone, R. J., & Heisler, L. K. (2016). Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12225>
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771-784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752-758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- de Gortari, P., Mancera, K., Cote-Vélez, A., Amaya, M. I., Martínez, A., Jaimes-Hoy, L., & Joseph-Bravo, P. (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. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.09.010>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: The devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl 2, 136-153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, 76(6), 1057-1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
- Fan, Y., Xie, L., & Chung, C. Y. (2017). Signaling Pathways Controlling Microglia Chemotaxis. *Molecules and Cells*, 40(3), 163-168. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0011>
- Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology*, 28(3), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>
- Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebreg, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>
- Frago, L. M., & Chowen, J. A. (2017). Involvement of Astrocytes in Mediating the Central Effects of Ghrelin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030536>
- Frank, G. K. W. (2013). Altered Brain Reward Circuits in Eating Disorders: Chicken or Egg? *Current psychiatry reports*, 15(10), 396. <https://doi.org/10.1007/s11920-013-0396-x>
- Frank, G. K. W., Shott, M. E., Hagman, J. O., & Yang, T. T. (2013). Localized brain volume and white matter integrity alterations in adolescent anorexia nervosa. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 52(10), 1066-1075.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2013.07.007>
- Frintrop, L., Liesbrock, J., Paulukat, L., Johann, S., Kas, M. J., Tolba, R., Heussen, N., Neulen, J., Konrad, K., Herpertz-Dahlmann, B., Beyer, C., & Seitz, J. (2017). Reduced astrocyte density underlying brain volume reduction in activity-based anorexia rats. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/15622975.2016.1273552>
- Galmiche, M., Déchelotte, P., Lambert, G., & Tavolacci, M. P. (2019). Prevalence of eating disorders over the 2000-2018 period: A systematic literature review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 109(5), 1402-1413. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy342>
- Gamber, K. M., Huo, L., Ha, S., Hairston, J. E., Greeley, S., & Bjørnbæk, C. (2012). Over-Expression of Leptin Receptors in Hypothalamic POMC Neurons Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity. *PLOS ONE*, 7(1), e30485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030485>
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C. W., Pfluger, P. T., Fernandez, A. M., Luquet, S., Woods, S. C., Torres-Alemán, I., ... Tschöp, M. H. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell*, 166(4), 867-880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>
- Geske, F. J., Lieberman, R., Strange, R., & Gerschenson, L. E. (2001). Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death and Differentiation*, 8(2), 182-191. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400786>

- Gibson, D., & Mehler, P. S. (2019). Anorexia Nervosa and the Immune System-A Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/jcm8111915>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841-845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Gorman, A. M. (2008). Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: Recurring themes around protein handling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6A), 2263-2280. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00402.x>
- Gortari, P. de. (2009). La regulación de la conducta alimentaria en un modelo experimental de anorexia. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 14(4), 185-190.
- Gosselin, R.-D., Gibney, S., O'Malley, D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2009). Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience*, 159(2), 915-925. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.018>
- Granell, S., Molden, B. M., & Baldini, G. (2013). Exposure of MC4R to agonist in the endoplasmic reticulum stabilizes an active conformation of the receptor that does not desensitize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), E4733-E4742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219808110>
- Grzelak, T., Dutkiewicz, A., Paszynska, E., Dmitrzak-Weglarz, M., Slopian, A., & Tyszkiewicz-Nwafor, M. (2017). Neurobiochemical and psychological factors influencing the eating behaviors and attitudes in anorexia nervosa. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 73(2), 297-305. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0540-2>
- Gumenyuk, A. V., Rybalko, S. L., Savosko, S., Guzyk, M., Tykhomyrov, A., Ryzha, A. A., & Chaikovsky, Y. (2017). GFAP as a marker of reactive astrocytes in the mice brain following hemorrhagic stroke and HSV-I. *Biopolymers and Cell*, 33, 415-423. <https://doi.org/10.7124/bc.000965>
- Gutiérrez, I. L., González-Prieto, M., García-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C., & Madrigal, J. L. M. (2018). Alternative Method to Detect Neuronal Degeneration and Amyloid β Accumulation in Free-Floating Brain Sections With Fluoro-Jade. *ASN NEURO*, 10. <https://doi.org/10.1177/1759091418784357>
- Gutierrez, R., Simon, S. A., & Nicolelis, M. A. L. (2010). Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(1), 287-303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0855-09.2010>
- Herzog, D. B., Keller, M. B., Sacks, N. R., Yeh, C. J., & Lavori, P. W. (1992). Psychiatric comorbidity in treatment-seeking anorexics and bulimics. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 31(5), 810-818. <https://doi.org/10.1097/00004583-199209000-00006>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system.

- Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121-130.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2001). Extracellular ATP or ADP Induce Chemotaxis of Cultured Microglia through Gi/o-Coupled P2Y Receptors. *The Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01975.2001>
- Horst, N. K., & Laubach, M. (2013). Reward-related activity in the medial prefrontal cortex is driven by consumption. *Frontiers in Neuroscience*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00056>
- Howard, D., Negraes, P., Voineskos, A. N., Kaplan, A. S., Muotri, A. R., Duvvuri, V., & French, L. (2020). Molecular neuroanatomy of anorexia nervosa. *Scientific Reports*, 10(1), 11411. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67692-1>
- Hurst, P., Garfield, A. S., Marrow, C., Heisler, L. K., & Evans, M. L. (2012). Recurrent Hypoglycemia Is Associated with Loss of Activation in Rat Brain Cingulate Cortex. *Endocrinology*, 153(4), 1908-1914. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1827>
- Image Lab Software | Investigación Científica | Bio-Rad*. (s. f.). Recuperado 5 de noviembre de 2019, de <https://www.bio-rad.com/es-mx/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>
- ImageJ*. (s. f.). Recuperado 5 de noviembre de 2019, de <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Izquierdo, A. (2017). Functional Heterogeneity within Rat Orbitofrontal Cortex in Reward Learning and Decision Making. *Journal of Neuroscience*, 37(44), 10529-10540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1678-17.2017>
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Jekabsons, A., Mander, P. K., Tickler, A., Sharpe, M., & Brown, G. C. (2006). Fibrillar beta-amyloid peptide A β 1–40 activates microglial proliferation via stimulating TNF- α release and H₂O₂ derived from NADPH oxidase: A cell culture study. *Journal of Neuroinflammation*, 3(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-24>
- Jin, S., Kim, J. G., Park, J. W., Koch, M., Horvath, T. L., & Lee, B. J. (2016). Hypothalamic TLR2 triggers sickness behavior via a microglia-neuronal axis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep29424>
- JOHNSON, R. T., BREEDLOVE, S. M., & JORDAN, C. L. (2008). Sex Differences and Laterality in Astrocyte Number and Complexity in the Adult Rat Medial Amygdala. *The Journal of comparative neurology*, 511(5), 599-609. <https://doi.org/10.1002/cne.21859>
- Kang, W., & Hébert, J. M. (2011). Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Molecular Neurobiology*, 43(3), 147-154. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8163-7>
- Keller, D., Erö, C., & Markram, H. (2018). Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic Review. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00083>
- Kenny, P. J. (2019). Chapter 5—Reward deficits in compulsive eating. En P. Cottone, V. Sabino, C. F. Moore, & G. F. Koob (Eds.), *Compulsive Eating*

- Behavior and Food Addiction* (pp. 97-113). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816207-1.00005-6>
- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(45), 31052-31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>
- Kim, S. F. (2012). Animal models of eating disorders. *Neuroscience*, *211*, 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.024>
- Klastrup, C., Frølich, J., Winkler, L. A.-D., & Støvring, R. K. (2019). Hunger and satiety perception in patients with severe anorexia nervosa. *Eating and Weight Disorders: EWD*. <https://doi.org/10.1007/s40519-019-00769-7>
- Kongsui, R., Beynon, S. B., Johnson, S. J., & Walker, F. R. (2014). Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neuroinflammation*, *11*. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0182-7>
- Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M., & Carpenter, A. E. (2007). CellProfiler: Free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques*, *42*(1), 71-75.
- Land, B. B., Narayanan, N. S., Liu, R.-J., Gianessi, C. A., Brayton, C. E., Grimaldi, D. M., Sarhan, M., Guarnieri, D. J., Deisseroth, K., Aghajanian, G. K., & DiLeone, R. J. (2014). Medial prefrontal D1 dopamine neurons control food intake. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 248-253. <https://doi.org/10.1038/nn.3625>
- Lannes, N., Eppler, E., Etemad, S., Yotovski, P., & Filgueira, L. (2017). Microglia at center stage: A comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget*, *8*(69), 114393-114413. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23106>
- Lavagnino, L., Mwangi, B., Cao, B., Shott, M. E., Soares, J. C., & Frank, G. K. W. (2018). Cortical thickness patterns as state biomarker of anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, *51*(3), 241-249. <https://doi.org/10.1002/eat.22828>
- Lawson, E. A. (2017). The effects of oxytocin on eating behaviour and metabolism in humans. *Nature reviews. Endocrinology*, *13*(12), 700-709. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.115>
- Lebrun, B., Bariohay, B., Jean, A., Royal Canin, A., FRA (meeting organiser), & Académie vétérinaire de France, P., FRA (meeting organiser). (2006). Control of food intake: Neurobiological aspects. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, *1*, 289. <https://doi.org/10.4267/2042/47847>
- Leiser, S. C., Li, Y., Pehrson, A. L., Dale, E., Smagin, G., & Sanchez, C. (2015). Serotonergic Regulation of Prefrontal Cortical Circuitries Involved in Cognitive Processing: A Review of Individual 5-HT Receptor Mechanisms and Concerted Effects of 5-HT Receptors Exemplified by the Multimodal Antidepressant Vortioxetine. *ACS Chemical Neuroscience*, *6*(7), 970-986. <https://doi.org/10.1021/cn500340j>
- Li, K., Li, J., Zheng, J., & Qin, S. (2019). Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and Disease*, *10*(3), 664-675. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0720>

- Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., & Yao, W. (2019). An update on reactive astrocytes in chronic pain. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1524-2>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481-487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Linnartz-Gerlach, B., Kopatz, J., & Neumann, H. (2014). Siglec functions of microglia. *Glycobiology*, 24(9), 794-799. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu044>
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>
- Lull, M. E., & Block, M. L. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), 354-365. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.014>
- Lyoo, I. K., Yoon, S., Jacobson, A. M., Hwang, J., Musen, G., Kim, J. E., Simonson, D. C., Bae, S., Bolo, N., Kim, D. J., Weinger, K., Lee, J. H., Ryan, C. M., & Renshaw, P. F. (2012). Prefrontal cortical deficits in type 1 diabetes mellitus: Brain correlates of comorbid depression. *Archives of General Psychiatry*, 69(12), 1267-1276. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.543>
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(12), 679-689. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>
- MATLAB - El lenguaje del cálculo técnico—MATLAB & Simulink.* (s. f.). Recuperado 5 de noviembre de 2019, de <https://la.mathworks.com/products/matlab.html>
- Mazaheri, F., Snaidero, N., Kleinberger, G., Madore, C., Daria, A., Werner, G., Krasemann, S., Capell, A., Trümbach, D., Wurst, W., Brunner, B., Bultmann, S., Tahirovic, S., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Butovsky, O., & Haass, C. (2017). TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO reports*, 18(7), 1186-1198. <https://doi.org/10.15252/embr.201743922>
- Méquinion, M., Chauveau, C., & Viltart, O. (2015). The use of animal models to decipher physiological and neurobiological alterations of anorexia nervosa patients. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 68. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00068>
- Morizawa, Y. M., Hirayama, Y., Ohno, N., Shibata, S., Shigetomi, E., Sui, Y., Nabekura, J., Sato, K., Okajima, F., Takebayashi, H., Okano, H., & Koizumi, S. (2017). Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature Communications*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>
- Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex

- after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, 7(1), 13211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>
- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(6), 367-378. <https://doi.org/10.1038/nrn3745>
- Mühlau, M., Gaser, C., Ilg, R., Conrad, B., Leibl, C., Cebulla, M. H., Backmund, H., Gerlinghoff, M., Lommer, P., Schnebel, A., Wohlschläger, A. M., Zimmer, C., & Nunnemann, S. (2007). Gray matter decrease of the anterior cingulate cortex in anorexia nervosa. *The American Journal of Psychiatry*, 164(12), 1850-1857. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.06111861>
- Naik, A. A., Patro, N., Seth, P., & Patro, I. K. (2017). Intra-generational protein malnutrition impairs temporal astrogenesis in rat brain. *Biology Open*, 6(7), 931-942. <https://doi.org/10.1242/bio.023432>
- Nestler, E. J. (2004). *Neurobiology of Mental Illness*. Oxford University Press.
- Neumärker, K. J., Dudeck, U., Meyer, U., Neumärker, U., Schulz, E., & Schönheit, B. (1997). Anorexia nervosa and sudden death in childhood: Clinical data and results obtained from quantitative neurohistological investigations of cortical neurons. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 247(1), 16-22. <https://doi.org/10.1007/bf02916248>
- Ns, N., Dj, G., & Rj, D. (2009). Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(1), 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.10.004>
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 29(10), 3276-3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 844-856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>
- Okun, E., Griffioen, K. J., & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease. *Trends in neurosciences*, 34(5), 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005>
- Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, 2014, 861231. <https://doi.org/10.1155/2014/861231>
- Olude, M. A., Mustapha, O. A., Aderounmu, O. A., Olopade, J. O., & Ihunwo, A. O. (2015). Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00067>
- Öngür, D., & Price, J. L. (2000). The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebral Cortex*, 10(3), 206-219. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
- Origin: *Data Analysis and Graphing Software*. (s. f.). Recuperado 5 de noviembre de 2019, de <https://www.originlab.com/Origin>

- Pablos, R. M. de, Villarán, R. F., Argüelles, S., Herrera, A. J., Venero, J. L., Ayala, A., Cano, J., & Machado, A. (2006). Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, *26*(21), 5709-5719. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0802-06.2006>
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., DiProspero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D. L., Garza, D., Hubbert, C. C., Yao, T.-P., Baehrecke, E. H., & Taylor, J. P. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, *447*(7146), 859-863. <https://doi.org/10.1038/nature05853>
- Parisi, C., Napoli, G., Pelegrin, P., & Volonté, C. (2016). *M1 and M2 Functional Imprinting of Primary Microglia: Role of P2X7 Activation and miR-125b* [Review Article]. *Mediators of Inflammation*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2016/2989548>
- Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C. L., Kindblom, L. G., Liem, R., Hamberger, A., & Betsholtz, C. (1998). GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Experimental Cell Research*, *239*(2), 332-343. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3922>
- Perello, M., Cabral, A., Cornejo, M. P., De Francesco, P. N., Fernandez, G., & Uriarte, M. (2018). Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin. *Journal of Neuroendocrinology*, *0*(ja), e12677. <https://doi.org/10.1111/jne.12677>
- Petrovich, G. D., Ross, C. A., Holland, P. C., & Gallagher, M. (2007). Medial Prefrontal Cortex Is Necessary for an Appetitive Contextual Conditioned Stimulus to Promote Eating in Sated Rats. *Journal of Neuroscience*, *27*(24), 6436-6441. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5001-06.2007>
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, *27*(50), 6407-6418. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.308>
- Plata-Salamán, C. R., Sonti, G., Borkoski, J. P., Wilson, C. D., & M.H. Ffrench-Mullen, J. (1996). Anorexia induced by chronic central administration of cytokines at estimated pathophysiological concentrations. *Physiology & Behavior*, *60*(3), 867-875. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(96\)00148-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(96)00148-5)
- Prado, L., Luis-Islas, J., Sandoval, O. I., Puron, L., Gil, M. M., Luna, A., Arias-García, M. A., Galarraga, E., Simon, S. A., & Gutierrez, R. (2016). Activation of Glutamatergic Fibers in the Anterior NAc Shell Modulates Reward Activity in the aNAcSh, the Lateral Hypothalamus, and Medial Prefrontal Cortex and Transiently Stops Feeding. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(50), 12511-12529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1605-16.2016>
- Prevalencia de trastornos de la alimentación en adolescentes.* (s. f.). Recuperado 8 de abril de 2020, de https://imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=92406&id_seccion=2123&id_ejemplar=9065&id_revista=131

- Psychiatry Online | DSM Library*. (s. f.). Recuperado 21 de enero de 2020, de <https://dsm.psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/appi.books.9780890420249.dsm-iv-tr>
- Rao, R., Ennis, K., Mitchell, E. P., Tran, P. V., & Gewirtz, J. C. (2016). Recurrent Moderate Hypoglycemia Suppresses Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in the Prefrontal Cortex and Impairs Sensorimotor Gating in the Post-Hypoglycemia Period in Young Rats. *Developmental neuroscience*, 38(1), 74-82. <https://doi.org/10.1159/000442878>
- Reichelt, A. C., Westbrook, R. F., & Morris, M. J. (2015). Integration of reward signalling and appetite regulating peptide systems in the control of food-cue responses. *British Journal of Pharmacology*, 172(22), 5225-5238. <https://doi.org/10.1111/bph.13321>
- Reppucci, C. J., & Petrovich, G. D. (2016). Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: A single and double retrograde tracing study in rats. *Brain Structure & Function*, 221(6), 2937-2962. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1081-0>
- Reyes-Haro, D., Labrada-Moncada, F. E., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2015). Dehydration-Induced Anorexia Reduces Astrocyte Density in the Rat Corpus Callosum. *Neural Plasticity*, 2015, 474917. <https://doi.org/10.1155/2015/474917>
- Reyes-Haro, D., Labrada-Moncada, F. E., Varman, D. R., Krüger, J., Morales, T., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2016). Anorexia Reduces GFAP+ Cell Density in the Rat Hippocampus. *Neural Plasticity*, 2016, 2426413. <https://doi.org/10.1155/2016/2426413>
- Roh, E., Song, D. K., & Kim, M.-S. (2016). Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 48, e216. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.4>
- Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F. M., & Civelli, O. (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(1), 26-40. <https://doi.org/10.1002/cne.1191>
- Santos, T. O., Mazucanti, C. H. Y., Xavier, G. F., & Torrão, A. S. (2012). Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiology & Behavior*, 107(3), 401-413. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.019>
- Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R., & Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*, 96(1), 195-203. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00538-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00538-2)
- Schumm, S. N., Gabrieli, D., & Meaney, D. F. (2020). Neuronal Degeneration Impairs Rhythms Between Connected Microcircuits. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncom.2020.00018>
- Smith, P. M., & Ferguson, A. V. (2008). Neurophysiology of hunger and satiety. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(2), 96-104. <https://doi.org/10.1002/ddrr.13>
- Smith, R., Lane, R. D., Alkozei, A., Bao, J., Smith, C., Sanova, A., Nettles, M., & Killgore, W. D. S. (2018). The role of medial prefrontal cortex in the working

- memory maintenance of one's own emotional responses. *Scientific Reports*, 8(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21896-8>
- Smolders, S. M.-T., Kessels, S., Vanganswinkel, T., Rigo, J.-M., Legendre, P., & Brône, B. (2019). Microglia: Brain cells on the move. *Progress in Neurobiology*, 178, 101612. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.04.001>
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638-647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Solmi, M., Veronese, N., Favaro, A., Santonastaso, P., Manzato, E., Sergi, G., & Correll, C. U. (2015). Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 237-252. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.031>
- Sridharan, A., Pehar, M., Salamat, M. S., Pugh, T. D., Bendlin, B. B., Willette, A. A., Anderson, R. M., Kemnitz, J. W., Colman, R. J., Weindruch, R. H., Puglielli, L., & Johnson, S. C. (2013). Calorie restriction attenuates astrogliosis but not amyloid plaque load in aged rhesus macaques: A preliminary quantitative imaging study. *Brain Research*, 1508, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.02.046>
- Stauffer, W., Sheng, H., & Lim, H. N. (2018). EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms. *Scientific Reports*, 8(1), 15764. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33592-8>
- Subramaniam, S. R., & Federoff, H. J. (2017). Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 176. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00176>
- Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural Remodeling of Astrocytes in the Injured CNS. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 18(6), 567-588. <https://doi.org/10.1177/1073858411423441>
- Tan, Y.-L., Yuan, Y., & Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular Psychiatry*, 25(2), 351-367. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181-1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Timmerman, R., Burm, S. M., & Bajramovic, J. J. (2018). An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 242. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00242>
- Tkacs, N. C., Pan, Y., Raghupathi, R., Dunn-Meynell, A. A., & Levin, B. E. (2005). Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(12), 1645-1655. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600152>
- Tremblay, A., & Bellisle, F. (2015). Nutrients, satiety, and control of energy intake. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, 40(10), 971-979. <https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0549>

- Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, *91*(2), 260-292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
- Uher, R., Murphy, T., Brammer, M. J., Dalgleish, T., Phillips, M. L., Ng, V. W., Andrew, C. M., Williams, S. C. R., Campbell, I. C., & Treasure, J. (2004). Medial prefrontal cortex activity associated with symptom provocation in eating disorders. *The American Journal of Psychiatry*, *161*(7), 1238-1246. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.7.1238>
- Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: A study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophrenia Research*, *67*(2-3), 269-275. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(03\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(03)00181-6)
- van Aerde, K. I., & Feldmeyer, D. (2015). Morphological and physiological characterization of pyramidal neuron subtypes in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *25*(3), 788-805. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht278>
- Wang, W.-Y., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, *3*(10). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>
- Watanabe, M. (2009). Chapter 4—Role of the primate lateral prefrontal cortex in integrating decision-making and motivational information. En J.-C. Dreher & L. Tremblay (Eds.), *Handbook of Reward and Decision Making* (pp. 79-96). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374620-7.00004-2>
- Watts, A. G., Sanchez-Watts, G., & Kelly, A. B. (1999). Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(14), 6111-6121.
- Watts, Alan G. (1998). Dehydration-Associated Anorexia: Development and Rapid Reversal. *Physiology & Behavior*, *65*(4-5), 871-878. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00244-3)
- Watts, Alan G. (2000). Understanding the Neural Control of Ingestive Behaviors: Helping to Separate Cause from Effect with Dehydration-Associated Anorexia. *Hormones and Behavior*, *37*(4), 261-283. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1581>
- Watts, Alan G., & Boyle, C. N. (2010). The functional architecture of dehydration-anorexia. *Physiology & Behavior*, *100*(5), 472-477. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.010>
- Wierenga, C. E., Bischoff-Grethe, A., Melrose, A. J., Irvine, Z., Torres, L., Bailer, U. F., Simmons, A., Fudge, J. L., McClure, S. M., Ely, A., & Kaye, W. H. (2015). Hunger does not motivate reward in women remitted from anorexia nervosa. *Biological Psychiatry*, *77*(7), 642-652. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.09.024>
- Winkler, Z., Kutí, D., Polyák, Á., Juhász, B., Gulyás, K., Lénárt, N., Dénes, Á., Ferenczi, S., & Kovács, K. J. (2019). Hypoglycemia-activated Hypothalamic

- Microglia Impairs Glucose Counterregulatory Responses. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42728-3>
- Won, S. J., Kim, J. H., Yoo, B. H., Sohn, M., Kauppinen, T. M., Park, M.-S., Kwon, H.-J., Liu, J., & Suh, S. W. (2012). Prevention of hypoglycemia-induced neuronal death by minocycline. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 225. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-225>
- Yager, J., Andersen, A., Devlin, M., Egger, H., Herzog, D., Mitchell, J., Powers, P., Yates, A., & Zerbe, K. (2002). *Practice guideline for the treatment of patients with eating disorders, second edition*. American Psychiatric Association.
- Yamamoto, T., & Ueji, K. (2011). Brain Mechanisms of Flavor Learning. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00076>
- Yang, L., Qi, Y., & Yang, Y. (2015). Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. *Cell Reports*, 11(5), 798-807. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.002>
- Zald, D. H. (2009). Orbitofrontal cortex contributions to food selection and decision making. *Annals of Behavioral Medicine: A Publication of the Society of Behavioral Medicine*, 38 Suppl 1, S18-24. <https://doi.org/10.1007/s12160-009-9117-4>
- Zhang, B., Nakata, M., Nakae, J., Ogawa, W., & Yada, T. (2018). Central insulin action induces activation of paraventricular oxytocin neurons to release oxytocin into circulation. *Scientific Reports*, 8(1), 10415. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28816-w>
- Zhang, H., Zou, Y., & Lei, H. (2019). Regional metabolic differences in rat prefrontal cortex measured with in vivo 1H-MRS correlate with regional histochemical differences. *NMR in Biomedicine*, 32(1), e4024. <https://doi.org/10.1002/nbm.4024>
- Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., Ma, Y., & Zhang, L. (2019, junio 24). *The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions* [Research Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2019/9605265>
- Zilberter, Y., & Zilberter, M. (2017). The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: Ways and mechanisms of metabolic correction. *Journal of Neuroscience Research*, 95(11), 2217-2235. <https://doi.org/10.1002/jnr.24064>

11. APÉNDICE 1

ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA DE ASTROCITOS Y MICROGLÍA

Se seleccionaron imágenes individuales de microglía y astrocitos procurando que estén completos y que sean la mayor cantidad de células posibles. Las imágenes deben ser de 8 bits, posteriormente estas deben hacerse binarias (process – binary – make binary), posteriormente se realiza el esqueleto de cada imagen (plugin – skeleton) y finalmente se analiza la imagen (analyze – skeleton – analyze skeleton (2D/3D)). Con esto se obtendrá una tabla con los parámetros de número de procesos, longitud total de procesos, complejidad de la ramificación (endpoints), área y perímetro. Este proceso puede ser automatizado utilizando un macro del mismo programa ImageJ. (plugins – macros – edit).

Una vez obtenidos estos parámetros se realizó un análisis de cluster K-mean, utilizando Matlab, para realizar esta prueba primero se debe conocer el número ideal de clusters, el cual se obtiene con la prueba de silhouette. El número ideal de clusters se coloca en la prueba K-mean para que agrupe los datos (el código de Matlab se muestra a continuación). De esta manera, se obtendrá una tabla diciendo a que grupo pertenece cada célula y es posible identificar el fenotipo más común de cada uno de los grupos.

Código Matlab:

- 1) Prueba silhouette. 1:6 indica el número de parámetros que se colocan en la tabla de Matlab. X es el nombre de la tabla.

```
E = evalclusters(X,'kmeans','silhouette','klist',[1:6])
```

- 2) Con este código, matlab agrupa tus datos dependiendo del grupo al que pertenecen. X es el nombre de la tabla. 4 el número ideal de clusters.
opts = statset('Display','final');
[idx,C] = kmeans(X,4,'Distance','cityblock',...
'Replicates',5,'Options',opts);

12. APÉNDICE 2. ARTÍCULO

Behavioural Brain Research 392 (2020) 112606



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Anorexia induces a microglial associated pro-inflammatory environment and correlates with neurodegeneration in the prefrontal cortex of young female rats



Pamela Reyes-Ortega^a, Durairaj Ragu Varman^{a,c}, Verónica M. Rodríguez^b, Daniel Reyes-Haro^{a,*}

^aDepartamento de Neurobiología Celular y Molecular. Instituto de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. Boulevard Juriquilla #3001. Juriquilla, Querétaro; CP 76230, México

^bDepartamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Instituto de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. Boulevard Juriquilla #3001. Juriquilla, Querétaro; CP 76230, México

^cDepartment of Pharmacology and Toxicology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Anorexia
Cerebral Cortex
Microglia
Interleukin 1 beta (IL-1 β)
Interleukin 6 (IL-6)
Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)

ABSTRACT

Dehydration-Induced Anorexia (DIA) is a murine model that reproduces weight loss and avoidance of food, despite its availability. The prefrontal cortex (PFC) integrates sensory inputs and updates associative learning to promote (hunger) or inhibit (satiety) food-seeking behavior. In this study we tested if anorexia induces a pro-inflammatory environment associated with microglia in the medial prefrontal cortex (mPFC) and orbitofrontal cortex (OFC), specific subregions of the PFC involved in appetite. Our results showed that anorexia increased microglial density, promoted a de-ramified morphology and augmented the de-ramified/ramified ratio in the mPFC and OFC but not in the motor cortex. Anorexia also increased the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β . This pro-inflammatory environment associated with microglia activation correlates with neuronal damage as revealed by Fluoro Jade C (FJC) and NeuN immunolabeling. We conclude that anorexia triggers a pro-inflammatory environment associated with microglia that correlates with neurodegeneration in the mPFC and OFC.

1. Introduction

The control of appetite and food intake relies on reward representations formed in the prefrontal cortex (PFC), specifically the medial prefrontal cortex (mPFC) and orbitofrontal cortex (OFC), where sensory inputs are integrated by associative learning to represent the sight of food and promote food-seeking behavior (hunger) or inhibit it (satiety) [1,2]. The mPFC is linked with feeding, motivation to eat, foraging [3–7], and anorexia [8,9]. The OFC receives sensory input related to feeding such as smell, taste, sight, and visceral afferent [10], and is related to reward value [11]. Moreover, recent studies demonstrated that appetite can also be inhibited by the OFC under specific social situations [12]. Anorexia is known to reduce appetite and, consequently, food intake [13]. Anorexia nervosa (AN) is the third most common chronic disease among adolescent females (90–95%) and has the highest mortality rate of any mental illness [14,15]. This eating disorder is characterized by a restricted caloric intake, severe weight loss, amenorrhea, and body image disturbance [16,17]. However, little

is known about the neurobiology of AN, and the lack of effective treatments justifies the use of animal models. Adaptive anorexia is associated with hibernation, migration or incubation, as a part of the life cycle of animals [18]. Dehydration-induced anorexia (DIA) is another example of adaptive anorexia, where reduced food-intake occurs to ameliorate hyperosmolaemia. As a murine model, DIA reproduces weight loss and reduces food intake despite its availability. The effects of fasting over dehydration are distinguished with a pair-fed group of animals under forced food restriction (FFR) [19–22].

In contrast, activity-based anorexia (ABA) is another murine model that reproduces the volume reduction observed in the cerebral cortex from human patients with anorexia [23–29]. The ABA model also reported astrocyte deficits in the cerebral cortex of the rat [28,29]. On the other hand, pro-inflammatory cytokines like tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1-beta (IL-1 β) are known to inhibit feeding/appetite [30–32]. The overexpression of these cytokines is also associated with reactive glia in the DIA model [33,34]. Thus, the aim of this study was to test if DIA induces a pro-

* Corresponding author at: Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro CP76230, Mexico.
E-mail address: dharo@unam.mx (D. Reyes-Haro).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112606>

Received 2 November 2019; Received in revised form 12 February 2020; Accepted 27 February 2020
Available online 06 May 2020

0166-4328/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

inflammatory environment associated with microglia and neurodegeneration in the PFC of young female rats.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Housing

All the experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM. Animals were handled in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). Female Wistar rats (180-200 g) were individually housed under a 12:12-h light/dark cycle and controlled temperature.

2.2. Dehydration-induced anorexia paradigm

The DIA paradigm was previously reported [19,33–36]. Briefly, two independent series of experiments were performed for five days. The control group (n = 7) received water and food *ad libitum*. The DIA group (n = 7) received a saline solution (NaCl 2.5%) with free access to food. The forced food restricted (FFR) group (n = 7) received full access to water and the same quantity of food consumed by DIA rats (Fig. 1A). Body weight and food intake were recorded daily at noon for all the experimental groups (Fig. 1B, C).

2.3. Histology and immunofluorescence

Rats were euthanized with pentobarbital (100 mg/kg) and transcardially perfused with saline solution, followed by chilled paraformaldehyde (4%) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Brains were removed, post-fixed overnight and cryoprotected in sucrose (30%). Sagittal sections (30 µm) containing the PFC were obtained with a cryostat (Leica CM1850) and stored in cryoprotectant solution (30% ethylene glycol: 20% glycerol in PBS) at -20 °C [33–35]. The immunoreactivity for ionized calcium-binding adapter (IBA-1), a specific marker for microglia [37], was performed on floating sections. The sections were rinsed three times in PBS buffer for 10 min. The tissue

was then placed in blocking solution (5% horse serum albumin 1%, Triton X-100 in PBS) for 1 h. Sections were incubated overnight with polyclonal rabbit anti-IBA-1 antibody (dilution 1:1000, Wako, Life Sciences). After washing, the primary antibody was detected with Alexa 594 (1:500, Invitrogen) coupled to goat anti-rabbit antibody. The sections were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted with Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (see Table 1 for more information about antibodies used in this study). The PFC sections were mounted on slides and photographed with a digital camera (Photometrics Cool Snap FX, Tucson, AZ, USA) attached to a Nikon microscope (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japan), and images were analyzed using IMAGE J version 1.41 (NIH, Bethesda, MD, USA). A Zeiss LSM 780 Meta confocal microscope (Zeiss, Gottingen, Germany) was used for confocal images with Alexa 594 (excitation/emission wavelength 590/617 nm) and DAPI (excitation/emission wavelength 350/460 nm).

2.4. Microglial cell counting [58]

The IBA-1 + cells and DAPI-labeled nuclei were quantified to estimate microglial density for each subfield of the PFC. The mPFC included the infralimbic cortex (IL), pre- limbic cortex (PRL) and anterior cingulate cortex (regions Cg1 and Cg2). The OFC included the ventral and medial orbital cortex (VO and MO). The motor cortex refers to the secondary motor cortex (M2), which was a positive control because it has not been related to anorexia [38]. Microglia quantification was performed in sagittal sections of the PFC of the bregma 0.40 and 0.90 mm (Fig. 1D, E) from the midline, according to the Paxinos and Watson atlas [39]. The PFC regions were identified based on this atlas. Cell counting was as previously described [33–35,40]. Briefly, microglial cells were identified as primary objects. Identification with CellProfiler considered cell size and form as image intensity and depth. The number of cells for control, DIA and FFR groups was calculated, and density (number of cells per mm²) was estimated. Only process-bearing cells showing their soma in the plane of the analyzed area were counted, and their density was estimated (number of cells per mm²). The microglia/nuclei ratio was calculated by dividing the number of IBA-1 + cells by

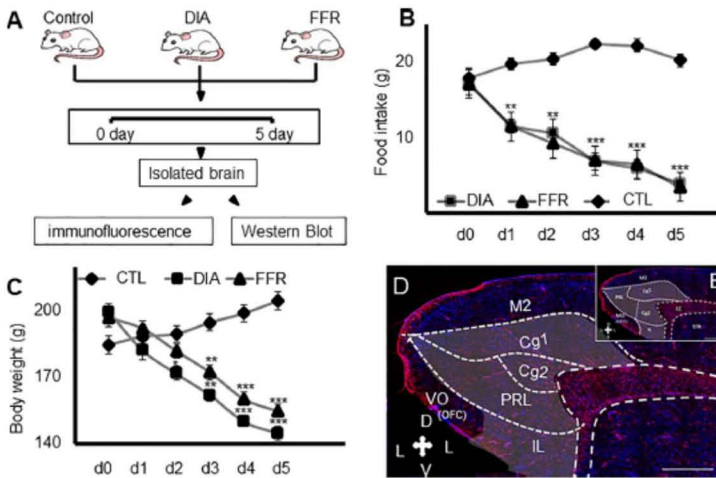


Fig. 1. Daily food intake and body weight. (A) DIA paradigm. The control group received water and food *ad libitum*. The DIA group received a saline solution (NaCl 2.5%) with food *ad libitum*. The forced food restricted (FFR) group received full access to water and the same quantity of food consumed by DIA rats. Body weight and food intake were recorded daily at noon for all the experimental groups. Finally, on the fifth day the rats were sacrificed, and the brains isolated. The food intake (B) and body weight (C) of young female rats were monitored daily for five days in each experimental group. DIA animals decreased their food intake from the first day, and this was reflected in the body weight. The FFR group was pair-fed to DIA intake. Data are shown as mean ± S.E.M. Significant differences were considered as * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. (D) Representative example of IBA-1 immunofluorescence in the prefrontal cortex (PFC) of a control rat (Section 0.40 mm lateral to midline of the Paxinos and Watson atlas). The shaded region shows analyzed subregions of the mPFC. (E) Representative example of IBA-1 immunofluorescence in the PFC of a control rat (Section 0.90 mm lateral to midline of the Paxinos and Watson atlas). The shaded region shows analyzed subregions of the mPFC. Selected regions for analysis were: mPFC (infralimbic = IL; pre- limbic = PRL; Cingulate 1 and 2 = Cg1, Cg2), OFC (Ventral-orbital = VO and Medial orbital = MO) and M2. The white arrow shows anatomical orientation: dorsal (D), ventral (V) and lateral (L). Section 0.90 mm lateral to midline of the Paxinos and Watson atlas. Scale bar = 200 µm.

fluorescence in the PFC of a control rat (Section 0.90 mm lateral to midline of the Paxinos and Watson atlas). The shaded region shows analyzed subregions of the mPFC. Selected regions for analysis were: mPFC (infralimbic = IL; pre- limbic = PRL; Cingulate 1 and 2 = Cg1, Cg2), OFC (Ventral-orbital = VO and Medial orbital = MO) and M2. The white arrow shows anatomical orientation: dorsal (D), ventral (V) and lateral (L). Section 0.90 mm lateral to midline of the Paxinos and Watson atlas. Scale bar = 200 µm.

Table 1
Antibody table.

Antibody	Species	Dilution	Company (Catalog#)
Immunofluorescence primary antibodies			
IBA-1	Rabbit	1:1000	Wako, Life Sciences (019-19741)
NeuN	Mouse	1:500	Millipore (MAB377)
Immunofluorescence secondary antibodies			
Anti-rabbit Alexa 594	Donkey	1:500	Invitrogen (A21207)
Anti-mouse Alexa 594	Donkey	1:500	Invitrogen (A21203)
Western blot primary antibodies			
IBA-1	Rabbit	1:5000	Wako, Life Sciences (019-19741)
TNF- α	Mouse	1:1000	Santacruz, Dallas, TX, USA (sc-133192)
IL-6	Mouse	1:1000	Santacruz, Dallas, TX, USA (sc-57315)
IL-1 β	Rabbit	1:1000	Millipore (AB1413)
GAPDH	Mouse	1:1000	Santacruz, Dallas, TX, USA (sc-47724)
Western blot secondary antibodies			
Goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugated antibody	Goat	1:2500	Santacruz, Dallas, TX, USA (sc-2058)
Goat anti-mouse alkaline phosphatase conjugated antibody	Goat	1:2500	Santacruz, Dallas, TX, USA (sc-2057)
Fluoro-jade C		0.004%	Millipore (AG325)

the total number of DAPI-labeled nuclei.

2.4.1. Cell shape analysis

Microglia respond to an insult or a pathological challenge with morphological changes that include area, perimeter, number of processes, process length and ramification complexity (endpoints). We estimated these parameters as previously described [41]. Briefly, all the images were converted to binary and skeletonized images with ImageJ software (National Institute of Health, <https://imagej.nih.gov/ij/34>). The analyze skeleton plugin was applied to the converted image and the corresponding morphological parameters were estimated per cell. A K-means clustering analysis was performed based on these parameters and four clusters of microglia were identified, corresponding to four phenotypes: ramified+, ramified, de-ramified and de-ramified+. The percentage of microglia for each phenotype was estimated for all the experimental groups. In order to simplify the results, we grouped de-ramified and de-ramified + microglia phenotypes into the de-ramified group. The same criterion was applied for ramified + and ramified microglia, resulting in the ramified group. Thus, the de-ramified/ramified ratio was estimated by dividing these two groups.

2.5. Western blot

The PFC from three different rats for each experimental group (Control, DIA and FFR) were homogenized in ice-cold lysis buffer (200 mM glycine, 150 mM NaCl, 50 mM EGTA, 50 mM EDTA and 300 mM sucrose) along with a protease inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The total homogenate was centrifuged at 10,000 X g for 15 min at 4 °C; then the supernatants were stored at -80 °C. Concentration of protein from each sample was estimated by Bradford's method [42], and 30 μ g of equal concentration of protein was resolved by 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred electrophoretically to the PVDF membrane and incubated in blocking solution (5% nonfat dry milk in TBS-T) for 3 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4 °C with one of the following primary antibodies: (a) polyclonal rabbit anti-IBA-1 (dilution 1:5000, Wako); (b) monoclonal mouse anti-TNF- α (dilution 1:1000, Santacruz, Dallas, TX, USA); (c) monoclonal mouse anti-IL-6 (dilution 1:1000, Santacruz, Dallas, TX, USA); (d) polyclonal rabbit anti-IL-1 β (dilution 1:1000, Millipore); and (e) monoclonal mouse anti-GAPDH (dilution 1:1000, Santacruz, Dallas, TX, USA). The membranes were washed three times with TBS-T, and bound antibodies were detected by incubating for 3 h with either goat anti-mouse alkaline phosphatase conjugated antibody (dilution 1:2500; Santacruz, Dallas, TX, USA) or goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugated antibody (dilution 1:2500; Santacruz, Dallas, TX, USA). Alkaline phosphatase activity was detected using the BCIP/NBT AP.

conjugate substrate reaction kit (Bio-Rad, USA) (see Table 1 for more information about antibodies used in this study).

Images were acquired with a Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), and optical density of trace quantity for each band was measured using Image Lab 3.0 software (Bio-Rad Laboratories Inc.).

2.6. Double labeling of FJC + cells with NeuN

The immunoreactivity for neuronal nuclei (NeuN), a specific marker for neurons [43], was performed on floating sections. Double labeling of the Fluoro-Jade C (FJC) and NeuN was done as previously described [44]. The sections were rinsed three times in PBS buffer for 10 min. The tissue was then placed in blocking solution (5% horse serum albumin 1%, Triton X-100 in PBS) for 1 h. Sections were incubated overnight with monoclonal mouse anti-NeuN antibody (dilution 1:500, Millipore). After washing, the primary antibody was detected with Alexa 594 (1:500, Invitrogen) coupled to goat anti-mouse antibody. FJC histochemistry started with a 2 min distilled water bath, followed by 5 min of potassium permanganate (0.06%), under agitation. The excess of permanganate was removed with a bath of distilled water, followed by incubation with FJC for 10 min (dilution 0.0004%) and an additional 1 min bath of distilled water. The histological sections received a xylool bath and were mounted with Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

The slides were photographed with a digital camera (Photometrics Cool Snap FX, USA) attached to a Zeiss LSM 780 Meta confocal microscope (Zeiss, Gottingen, Germany). The corresponding confocal images were obtained for NeuN-Alexa 594 (excitation/emission wavelength 590/617 nm) and FJC (excitation/emission wavelength 495/521 nm). FJC/NeuN + cells were counted with the EZC-co-localization plugin for ImageJ [45]. This plugin selects individual cells from images based on physical parameters. The signal intensity and Pearson correlation coefficient (PCC) between the two channels was obtained for pixel values. Complete co-localization was accepted when PCC = 1, and co-localization was represented as the number of FJC-NeuN + cells/mm² for each experimental group.

2.7. Statistics

All the data are presented as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis of data was performed using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test with Origin 7.0 software; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Table 2
Effect of dehydration induced anorexia or forced food restriction on microglia density.

Cortex region	Control	DIA	FFR
Nuclei			
mPFC	1756 ± 122 (N = 7)	1641 ± 83 (N = 7)	1643 ± 80 (N = 7)
OFC	1893 ± 138 (N = 6)	1951 ± 158 (N = 6)	1896 ± 139 (N = 6)
M2	1386 ± 128 (N = 6)	1388 ± 38 (N = 7)	1388 ± 118 (N = 7)
Microglia			
mPFC	154 ± 11 (N = 7)	313 ± 25 (N = 7)***	331 ± 33 (N = 7)***
OFC	185 ± 15 (N = 6)	353 ± 19 (N = 6)***	375 ± 27 (N = 6)***
M2	76 ± 9 (N = 6)	92 ± 10 (N = 7)	89 ± 9 (N = 7)
Microglia/Nuclei ratio			
mPFC	0.09 ± 0.01 (N = 7)	0.20 ± 0.02 (N = 7)**	0.22 ± 0.02 (N = 7)***
OFC	0.10 ± 0.01 (N = 6)	0.20 ± 0.02 (N = 6)*	0.21 ± 0.02 (N = 6)**
M2	0.05 ± 0.01 (N = 6)	0.07 ± 0.02 (N = 7)	0.06 ± 0.01 (N = 7)
Total process length			
mPFC	258 ± 16 (N = 7)	29 ± 11 (N = 7)***	90 ± 16 (N = 7)***
OFC	255 ± 29 (N = 6)	91 ± 11 (N = 6)***	34 ± 16 (N = 6)***
M2	252 ± 20 (N = 6)	224 ± 16 (N = 7)	256 ± 20 (N = 7)
Area			
mPFC	1629 ± 94 (N = 7)	469 ± 65 (N = 7)***	735 ± 85 (N = 7)***
OFC	1564 ± 207 (N = 6)	668 ± 92 (N = 6)***	866 ± 91 (N = 6)***
M2	1551 ± 111 (N = 6)	1262 ± 92 (N = 7)	1444 ± 117 (N = 7)
Perimeter			
mPFC	31 ± 3 (N = 7)	29 ± 2 (N = 7)***	34 ± 2 (N = 7)***
OFC	29 ± 2 (N = 6)	10 ± 1 (N = 6)***	14 ± 1 (N = 6)***
M2	4.5 ± 1 (N = 6)	13 ± 1 (N = 7)	15 ± 1 (N = 7)
Number of process			
mPFC	4.5 ± 0.2 (N = 7)	2.7 ± 0.3 (N = 7)***	2.3 ± 0.2 (N = 7)***
OFC	4.1 ± 0.2 (N = 6)	2.2 ± 0.2 (N = 6)***	2.4 (N = 6)***
M2	4.5 ± 1 (N = 6)	4.4 ± 0.3 (N = 6)	4.5 ± 0.3 (N = 6)
Number of endpoints			
mPFC	72 ± 4.2 (N = 7)	35 ± 8.2 (N = 7)***	33 ± 7.9 (N = 7)***
OFC	75 ± 2.7 (N = 6)	31 ± 10 (N = 6)***	34 ± 9 (N = 6)***
M2	72 ± 4.3 (N = 6)	73 ± 5.3 (N = 6)	71 ± 5.2 (N = 6)
De-ramified/Ramified microglia ratio			
mPFC	0.26 ± 0.03 (N = 7)	6.81 ± 1.34 (N = 7)*	7.06 ± 0.93 (N = 7)*
OFC	0.25 ± 0.04 (N = 6)	6.6 ± 1.48 (N = 6)*	6.71 ± 1.18 (N = 6)*
M2	0.33 ± 0.02 (N = 6)	0.20 ± 0.01 (N = 6)	0.24 ± 0.03 (N = 6)
NeuN +			
mPFC	1015 ± 98 (N = 4)	763 ± 42 (N = 4)**	744 ± 65 (N = 4)**
OFC	960 ± 83 (N = 4)	738 ± 28 (N = 4)**	694 ± 64** (N = 4)
M2	1090 ± 81 (N = 4)	890 ± 127 (N = 4)	958 ± 74 (N = 4)

3. Results

3.1. Body weight and food intake

For food intake, a two-way repeated measures ANOVA showed significant differences between groups ($F_{(2, 27)} = 240.89394$, $p < 0.001$). Food intake was significantly reduced on the fifth day of the experimental protocol for DIA (-80%) and FFR (-82%) when compared to the control group (20.3 ± 0.9 g; $p < 0.001$) (Fig. 1B).

For body weight, a two-way repeated measures ANOVA showed differences between groups ($F_{(2, 27)} = 102.24062$, $p < 0.0001$). Body weight on the fifth day of the experimental protocol was significantly reduced for DIA (-29%) and FFR animals (-25%) when compared to the control group (204.8 ± 3.95 g; $p < 0.0001$) (Fig. 1C).

3.2. Anorexia increases microglial density in mPFC and OFC but not in M2

Nuclear density in the mPFC showed no significant changes between groups ($F_{(2, 74)} = 0.44457$, $p = 0.6428$) (Table 2). However, microglial density in the mPFC showed significant differences between groups ($F_{(2, 74)} = 19.84027$, $p < 0.0001$) for both DIA ($p < 0.0001$) and FFR ($p < 0.0001$), when compared to the control (Table 1). The microglia/nuclei ratio was obtained by estimating the IBA-1+ cells from the total nuclei, and significant changes were identified between groups ($F_{(2, 74)} = 8.93267$, $p < 0.0001$) for the DIA ($p = 0.00242$) and FFR, when compared to the control ($p < 0.0001$) (Fig. 2A and Table 2). We also analyzed nuclear density in the OFC. A one-way ANOVA showed no

significant differences between groups ($F_{(2, 36)} = 0.04584$, $p = 0.95525$) (Table 2). Interestingly, microglial density in the OFC showed significant differences between groups ($F_{(2, 36)} = 19.84027$, $p < 0.0001$) for the DIA ($p < 0.0001$) and FFR ($p < 0.0001$), when compared to the control (Table 2). The microglia/nuclei ratio was significantly different between groups ($F_{(2, 36)} = 7.18759$, $p = 0.00236$), for the DIA ($p = 0.01117$) and FFR ($p = 0.00387$), when compared to the control (Fig. 2B and Table 2). Lastly, we analyzed M2 as a region that is not involved in appetite. M2 showed no significant changes in nuclei density between groups ($F_{(2, 15)} = 0.03376$, $p = 0.96687$). No significant changes were observed for microglia density between the groups ($F_{(2, 15)} = 0.7672$, $p = 0.48169$) (Fig. 2C and Table 2). Finally, the estimated microglia/nuclei ratio was not significantly different between groups ($F_{(2, 15)} = 0.41709$, $p = 0.66637$) (Fig. 2C and Table 2).

3.3. Anorexia promotes de-ramified microglia morphology in mPFC and OFC but not M2

Ramified and de-ramified microglia are usually associated with a healthy or a pathological state respectively. The automatized analysis of microglia morphology allows to identify both states in the brain. Thus, we tested the effect of anorexia on four parameters of microglial morphology (see Fig. 3 and Table 2). Our results showed that anorexia significantly decreased the area for mPFC (DIA: -57%; FFR: -45%; $p < 0.0001$) and OFC (DIA: -70%; FFR: -55%; $p < 0.0001$) but not for M2 (DIA: -19%; FFR: -7%; $p = 0.45$). The perimeter was also reduced

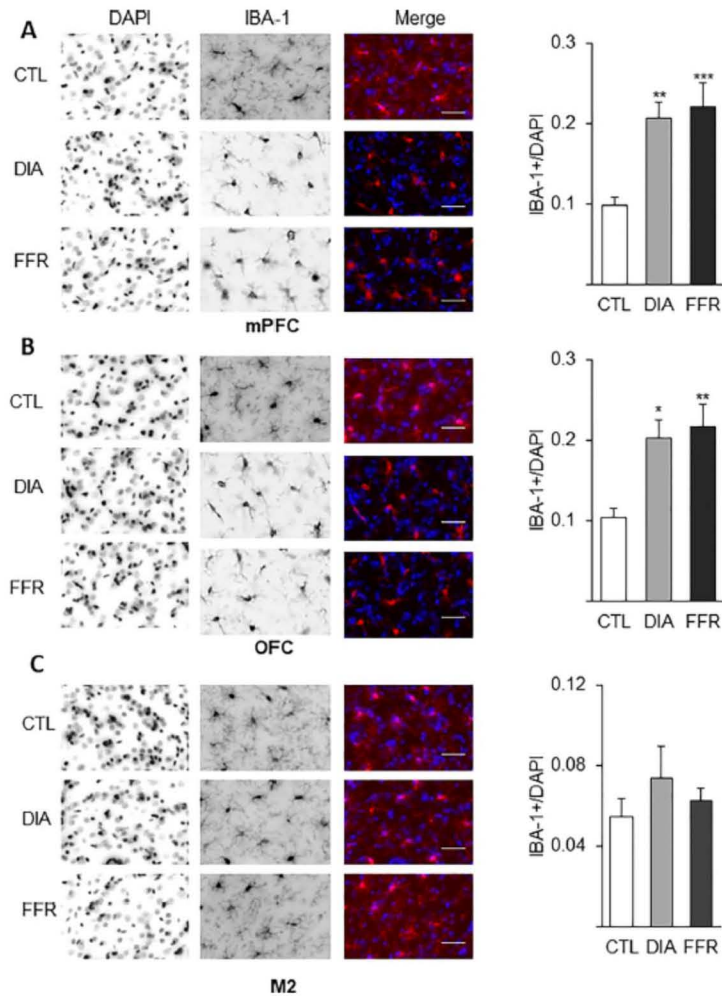


Fig. 2. Anorexia increases microglial density. Sagittal sections of the prefrontal cortex (PFC) show nuclei labeled with DAPI and cells immunostained with IBA-1 for the medial PFC (mPFC) (A), orbitofrontal cortex (OFC) (B) and secondary motor cortex (M2) (C). The overlay of DAPI and IBA-1 is shown for control (CTL), DIA and FFR groups. Scale bar = 50 μ m. The IBA-1 / DAPI ratio is plotted for each experimental group and each PFC region. The IBA-1+/DAPI ratio increased significantly for DIA and FFR in the mPFC and OFC, but not in M2. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Significant differences were considered as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

for mPFC (DIA: -57%; FFR: -50%; $p < 0.0001$) and OFC (DIA: -66%; FFR: -52%; $p < 0.0001$) but not for M2 (DIA: -6%; FFR: +10%; $p = 0.31$). The total length of the processes was significantly shortened for mPFC (DIA: -89%; FFR: -65%; $p < 0.0001$) and OFC (DIA: -64%; FFR: -37%; $p < 0.0001$) but not for M2 (DIA: -11%; FFR: +2%; $p = 0.45$). The number of processes was significantly diminished for mPFC (DIA: -40%; FFR: -49%; $p < 0.0001$) and OFC (DIA: -46%; FFR: -41%; $p < 0.0001$) but not for M2 (DIA: -2%; FFR: 0%; $p = 0.95$). The number of endpoints was reduced for mPFC (DIA: -51%; FFR: -44%; $p < 0.0001$) and OFC (DIA: -59%; FFR: -55%; $p < 0.0001$) but not for M2 (DIA: +1%; FFR: -1%).

3.4. Anorexia increases the de-ramified/ramified ratio in mPFC and OFC but not in M2

A K-means clustering analysis was performed and four microglia phenotypes were identified based on the previously estimated

morphologic parameters: ramified+, ramified, de-ramified and de-ramified+ (Fig. 4A). A similar distribution of these four microglia phenotypes was observed for the control group in mPFC (ramified+: 56%, ramified: 22%, de-ramified: 14%, de-ramified+: 8%), OFC (ramified+: 54%, ramified: 24%, de-ramified: 8%, de-ramified+: 14%) and M2 (ramified+: 53%, ramified: 24%, de-ramified: 15%, de-ramified+: 8%) (Fig. 4B). However, anorexia changed this pattern, favoring the de-ramified phenotype in mPFC (ramified+: 9%, ramified: 12%, de-ramified: 44%, de-ramified+: 35%) and OFC (ramified+: 14%, ramified: 12%, de-ramified: 27%, de-ramified+: 47%), but not in M2 (ramified+: 46%, ramified: 37%, de-ramified: 14%, de-ramified+: 8%) (Fig. 4B). Similar results to those of DIA were observed for the FFR experimental group in mPFC (ramified+: 9%, ramified: 19%, de-ramified: 31%, de-ramified+: 41%) and OFC (ramified+: 12%, ramified: 20%, de-ramified: 34%, de-ramified+: 34%), but not M2 (ramified+: 44%, ramified: 32%, de-ramified: 18%, de-ramified+: 6%) (Fig. 4B). Finally, to summarize and simplify this information we coupled

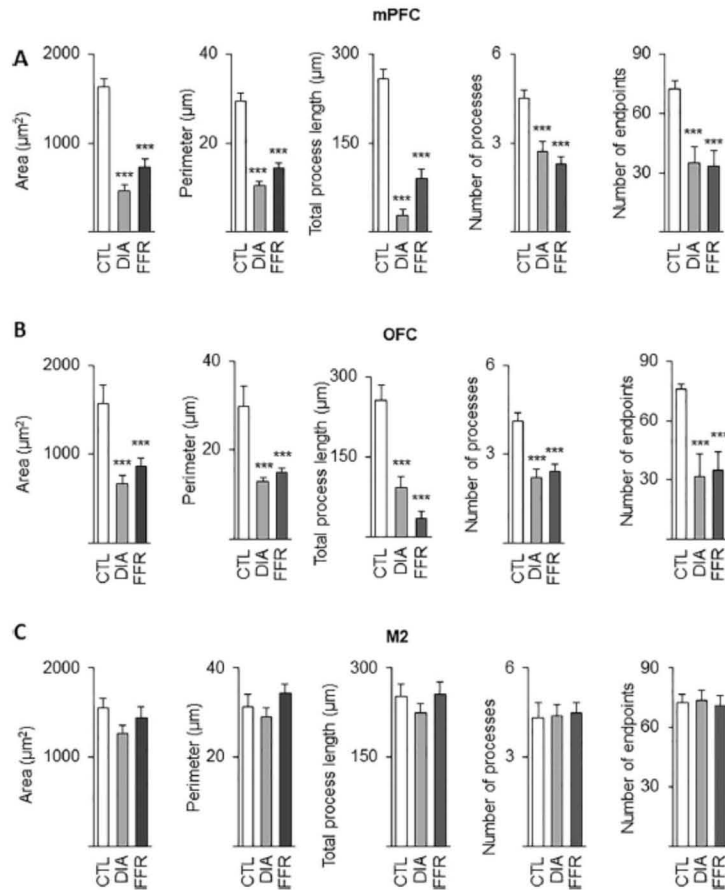


Fig. 3. Anorexia reduces microglial cell size, elongation and complexity of processes. The morphological parameters estimated for each experimental group were area, perimeter, total process length, number of processes and endpoints. All of them were significantly reduced in DIA and FFR groups when compared to the control (CTL) in mPFC (A) and OFC (B). However, no significant changes between experimental groups were observed for M2 (C). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Significant differences were considered as * $p < 0.001$.

ramified + and ramified phenotypes in the ramified group and de-ramified and de-ramified + phenotypes in the de-ramified group. Thus, the de-ramified/ramified ratio was obtained by dividing the corresponding groups for mPFC, OFC and M2. Notice that the ramified phenotype dominated for control groups in mPFC, OFC and M2, while the de-ramified phenotype predominated in the DIA and FFR experimental groups [mPFC: ($F_{(2,6)} = 11.02896$, $p = 0.0228$); OFC: ($F_{(2,6)} = 7.56852$, $p = 0.00978$)] but not in M2 ($F_{(2,6)} = 4.56852$, $p = 0.21$) (Fig. 4B and Table 2).

3.5. Anorexia increases prefrontal cortex expression of IBA-1, IL-6, TNF- α and IL-1 β

The effect of anorexia on IBA-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β expression was investigated by Western blot (Fig. 5). The expression of IBA-1 significantly increased between the experimental groups ($F_{(2,6)} = 270.77001$, $p < 0.0001$). IBA-1 increased significantly for the DIA ($p < 0.0001$) and FFR groups ($p = 0.00177$) compared to the

normalized control (Fig. 5). Similarly, the expression of TNF- α was significantly different between groups ($F_{(2,6)} = 267.84167$, $p < 0.0001$). TNF- α increased by DIA ($p < 0.0001$) and FFR ($p < 0.0001$) when compared to the normalized control. The expression of IL-6 also showed significant differences between groups ($F_{(2,6)} = 136.26812$, $p < 0.0001$). The expression of IL-6 significantly increased in DIA ($p < 0.0001$) and FFR groups ($p = 0.0001$). Finally, IL-1 β expression showed significant differences between experimental groups ($F_{(2,6)} = 47.34697$, $p < 0.0001$). IL-1 β expression increased in both DIA ($p < 0.0001$) and FFR ($p = 0.00177$) groups (Fig. 5).

3.6. Anorexia promotes neurodegeneration in the mPFC and OFC but not in M2

The effect of anorexia on neurodegeneration was investigated by double immunofluorescence experiments with FJC and NeuN. First, the percentage of FJC + cells was estimated from DAPI total counts for control (mPFC and OFC < 1%; M2 < 2%), DIA (mPFC = 16%; OFC =

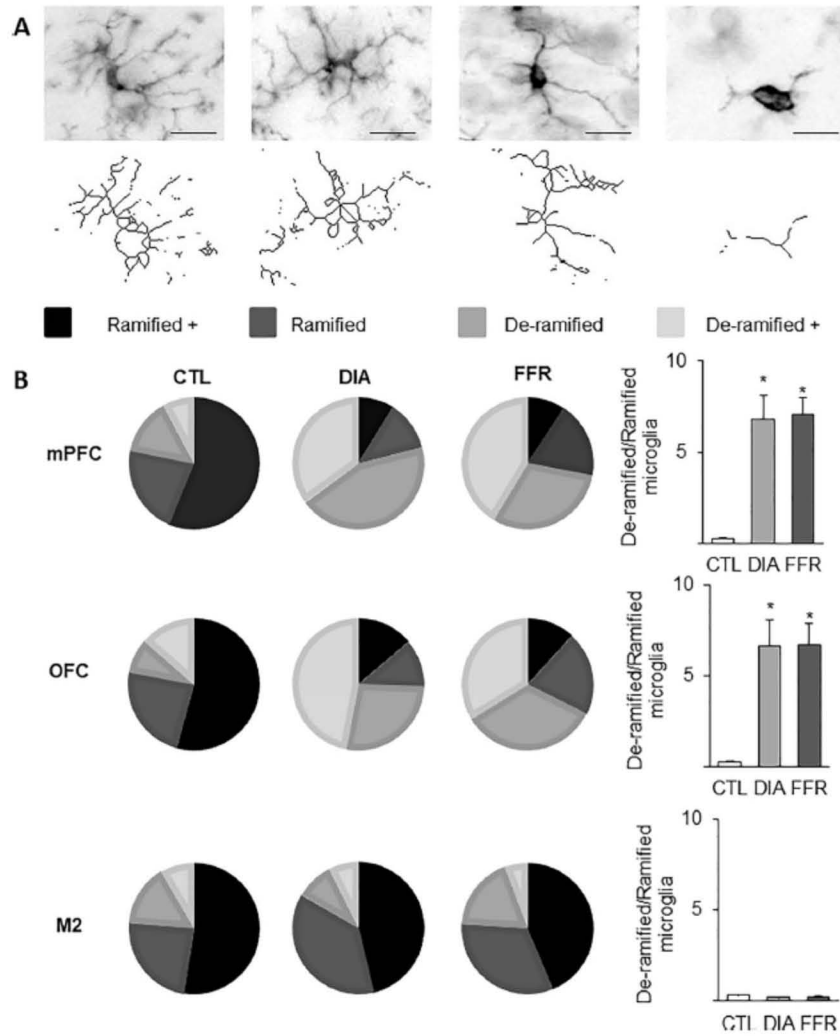


Fig. 4. Anorexia promotes a de-ramified microglia phenotype. (A) Four microglial phenotypes were identified by K-means cluster analysis based on microglial size, elongation and complexity of processes: ramified+, ramified, de-ramified and de-ramified+. The skeleton image of each microglia phenotype is also shown. Scale bar = 10 μ m. (B) Pie charts for mPFC, OFC and M2 show distribution of the four phenotypes for each experimental group (CTL, DIA and FFR). (C) De-ramified/Ramified microglia ratio. The four microglial phenotypes were grouped into de-ramified (de-ramified and de-ramified+) and ramified (ramified and ramified+) groups to simplify and summarize the effect of anorexia. Notice that anorexia increased the de-ramified phenotype selectively for mPFC and OFC. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Significant differences were considered as * $p < 0.05$.

13%; M2 < 2%) and FFR (mPFC = 15%; OFC = 11%; M2 = 2%) experimental groups. Our results showed that DIA and FFR significantly increased FJC+ cell density (Table 3). Our next step was to estimate the percentage of FJC+/NeuN+ cells from total counts of NeuN+ cells. Neuronal damage was practically absent in the control group for mPFC, OFC and M2 (Fig. 6 and Table 3). However, DIA and FFR induced neurodegeneration in the mPFC (-21% and -13%; $F_{(2, 47)} = 15.524$; $p < 0.0001$) and OFC (-30% and -12%; $F_{(2, 21)} = 7.08$; DIA: $p < 0.0044$; FFR: $p < 0.02$); but not in M2 (-1% and -2%; $F_{(2, 11)} =$

0.111; $p < 0.896$). The neuronal damage was estimated as FJC-NeuN+ cells/mm² and summarized in the corresponding graphs for each cortical region (Fig. 6 and Table 3).

4. Discussion

In this study DIA, a murine model of adaptive anorexia, was tested on: 1) Microglia morphology and density, 2) IBA-1 and pro-inflammatory cytokine expression, and 3) neurodegeneration. Reduced

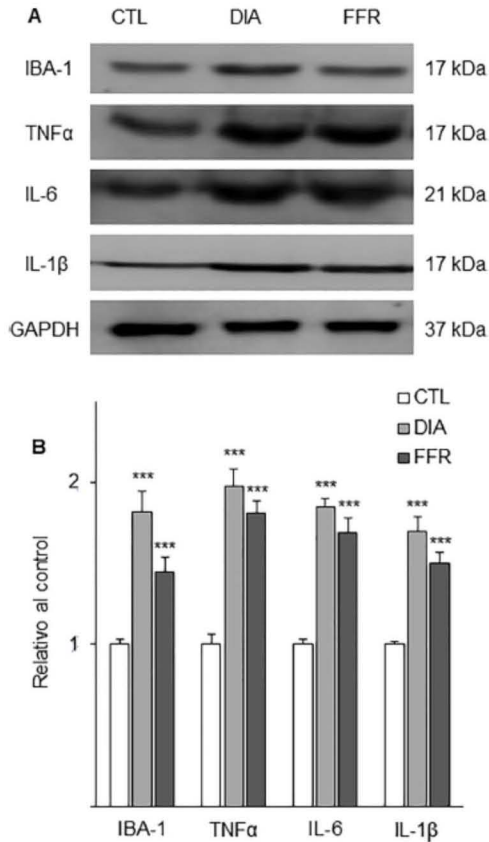


Fig. 5. Anorexia increases IBA-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β expression. (A) Representative western blot showing the expression of IBA-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β for each experimental group (CTL, DIA and FFR). GAPDH was used as internal control. (B) The band intensity of DIA and FFR groups was normalized to their respective controls for IBA-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β . Data are shown as mean \pm S.E.M. Significant differences were considered as *** $p < 0.005$.

Table 3
Effect of dehydration induced anorexia on degenerative cells.

	mPFC	OFC	M2
Control			
FJC+ (Total)	6 \pm 2 (N = 4)	6 \pm 3 (N = 4)	17 \pm 9 (N = 4)
FJC+ /NeuN+	4 \pm 2 (N = 4)	3 \pm 2 (N = 4)	11 \pm 9 (N = 4)
FJC+ /NeuN-	2 \pm 0.34 (N = 4)	3 \pm 0.59 (N = 4)	6 \pm 0.79 (N = 4)
DIA			
FJC+ (Total)	257 \pm 47 (N = 4)***	252 \pm 68 (N = 4)***	22 \pm 14 (N = 4)
FJC+ /NeuN+	162 \pm 32 (N = 4)***	218 \pm 64 (N = 4)**	5 \pm 1 (N = 4)
FJC+ /NeuN-	95 \pm 37 (N = 4)*	33 \pm 13 (N = 4)*	17 \pm 4 (N = 4)
FFR			
FJC+ (Total)	248 \pm 27 (N = 4)**	203 \pm 33 (N = 4)*	28 \pm 14 (N = 4)
FJC+ /NeuN+	94 \pm 9 (N = 4)***	81 \pm 17 (N = 4)**	11 \pm 9 (N = 4)
FJC+ /NeuN-	154 \pm 29 (N = 4)***	122 \pm 31 (N = 4)**	17 \pm 4 (N = 4)

food intake increased microglial density in the mPFC and OFC, brain regions of the PFC specifically involved in appetite, and did not induce changes in the motor cortex (M2). Furthermore, DIA also increased the expression of IBA-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the PFC. This pro-inflammatory environment associated with microglia resulted in neuronal damage in the mPFC and OFC. The PFC belongs to the mesocorticolimbic reward circuit involved in mood and addictive and feeding behaviors [46–48]. Recently, cortical cell density was investigated in the ABA paradigm, where astrocytes were significantly reduced but neuronal density was unchanged [29]. In contrast, neurodegeneration was observed in our study but only for mPFC and OFC. However, the whole cortex was considered for the ABA study, while specific regions of the PFC were selected for the DIA model. Another possibility to conciliate these differences is that ABA and DIA paradigms present a distinct degree of severity. In support of this view, *postmortem* studies in ill girls diagnosed with anorexia reported signs of degeneration in cortical neurons [49,50]. On the other hand, few studies have linked microglia with anorexia [33,51], even though it is one of the main cytokine producers in the brain. The release of the pro-inflammatory cytokines influences synaptic plasticity and may disturb normal central nervous system functions [52–54]. Moreover, administration of TNF- α , IL-6 or IL-1 β in the brain reduces food intake, supporting their potential involvement in triggering anorexia [30–32,55,56]. Additionally, recent studies implicate pro-inflammatory cytokines associated with microglia and astrocyte reactivity with neurodegeneration [57]. This mechanism may apply for the DIA model. Besides neuronal damage, we also observed a fraction of cells that were FJC+ but NeuN-; this population may correspond to degenerative neuroglia [58]. The DIA paradigm also disrupts the balance of de-ramified/ramified microglia in the PFC. Neuronal dysfunction is known to induce morphological changes in microglia observed as de-ramified cells. Microglial response can be mild to robust and regionally dependent across the cortex [41]. Indeed, we observed that anorexia increased the de-ramified/ramified microglia ratio selectively in mPFC and OFC, whereas no changes were observed in M2. Thus, the pro-inflammatory environment associated with microglia may influence the function of neuronal networks and should be considered as a key element to understand the neurobiology of anorexia. In support of this view, pro-inflammatory cytokines and microglia density were reported to be higher in the PFC of teenage suicide victims [59,60], suggesting a common root of neuroinflammation for neuropsychiatric disorders. Furthermore, cognitive impairment and dementia risk in aging are associated with cortical thinning and high concentrations of IL-6 [61]. A previous study reported that serum levels of IL-6 were increased in women with anorexia [62]. Accordingly, young women diagnosed with AN consistently show reduced volumes of grey matter in the mesocorticolimbic system where the PFC is located. The patients followed after weight recovery showed increases of grey matter volumes nearly to control levels in the OFC and mPFC, correlating with an improvement in eating and shape concerns [63]. Thus, reactive microglia may trigger increased expression of pro-inflammatory cytokines and induce cortical thinning as a consequence of neuronal damage. Overall, microglia can sensitively respond to pathological challenges in the brain that emerge before physical symptoms. We propose that microglia may help to monitor clinical genesis and progression of anorexia and may be an attractive target for the development of biomarkers.

5. Conclusion

We conclude that anorexia, independently of dehydration, increases de-ramified microglial density and the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β , and this correlates with neurodegeneration in the PFC. Further studies will elucidate if reactive microglia and increased expression of cytokines trigger the onset of anorexia. If so, new therapeutic approaches may consider reactive glia as a target.

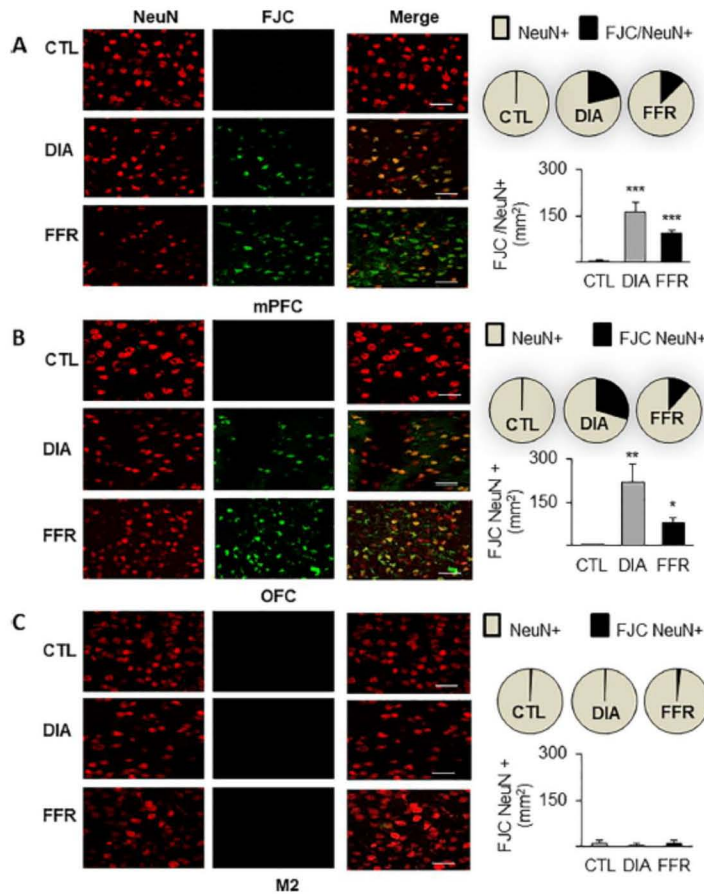


Fig. 6. Anorexia promotes neurodegeneration in the prefrontal cortex. Double immunofluorescence for NeuN and Fluoro-Jade C (FJC) in mPFC (A), OFC (B) and M2 (C). The overlay of NeuN and FJC is shown for control (CTL), DIA and FFR groups. Scale bar = 50 μ m. Pie charts show that FJC/NeuN+ cells increase in DIA and FFR groups when compared to CTL. The counting of FJC/NeuN+ cells/mm² is summarized for each experimental group in mPFC, OFC and M2. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Significant differences were considered as *** $p < 0.001$.

Author Statement

Pamela Reyes-Ortega: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization
 Durairaj Ragú-Varman: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization
 Verónica M. Rodríguez: Conceptualization, Methodology, Resources
 Daniel Reyes-Haro: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Supervision, Project Administration, Funding acquisition

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

The authors are grateful to E.N. Hernández-Ríos, A. Castilla, L. Casanova, A.E. Espino and M. García-Servín for their technical support. We are indebted to Dr. A. Martínez-Torres for providing invaluable support through the development of this study. Special thanks to Dr. R. Arellano-Ostoa for allowing us to use his histological facilities and Dr. T. Morales for a helpful discussion of the manuscript. The authors thank LCC J. González-Norris for proofreading the English version of this manuscript. D. Ragú-Varman was supported by DGAPA-UNAM as post-doctoral fellow. P. Reyes-Ortega is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and receives a fellowship from CONACYT (554231). This work was supported by PAPIIT-UNAM grants (IN201915 and IN205718) to D. Reyes-Haro.