



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EXPOSICIÓN POSNATAL A LIPOPOLISACÁRIDO COMBINADO CON UNA
DIETA ALTA EN GRASA, INDUCE INMUNOTOLERANCIA SIN PREVENCIÓN
DEL DETERIORO DE LA MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ISAAC VARGAS RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA.SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARIA DE LOS ÁNGELES ARACELÍ DÍAZ RUIZ

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

QUERÉTARO, QUERÉTARO MARZO 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.

Índice General

Agradecimientos institucionales	I
Agradecimientos personales	II
Resumen	1
Resumen gráfico	2
Antecedentes	3
▪ Macrófagos en el Sistema Nervioso Central	4
▪ Comunicación entre neuronas y microglía	4
▪ La microglía en el desarrollo del Sistema Nervioso Central	4
▪ Programación fetal	6
▪ Receptores TLR (Toll like receptor)	6
▪ Memoria de la respuesta inmune innata	7
▪ Diferencia entre sensibilización e inmunidad entrenada de microglía	7
▪ Características de la inmunidad entrenada	8
▪ Características de la sensibilización de microglía	8
▪ Entrenamiento de microglía	9
▪ Desensibilización de la microglía	9
▪ Tolerancia de la microglía	10
▪ Metabolismo de la respuesta inmune innata	10
▪ Sustrato receptor a insulina 2 (IRS2)	12

▪	Obesidad y dietas altas en grasa	12
▪	Endotoxemia metabólica	13
▪	Disbiosis	13
▪	Memoria de reconocimiento espacial	14
▪	Efecto de las dietas altas en grasa en cerebro	15
	Justificación	17
	Hipótesis	18
	Objetivo general	19
	Objetivos particulares	19
	Metodología	20
▪	Memoria espacial a corto plazo por laberinto en Y	20
▪	Construcción de nido	21
▪	Recolección de tejido	22
▪	Recolección de suero	22
▪	Histología	22
•	Tinción de Nissl	22
•	Inmunohistoquímica	22
▪	Análisis de transcripción reversa por reacción en cadena de la polimerasa	23
▪	Estereología	25
▪	Estadística	33
▪	Análisis morfométrico	35

■ Análisis de poblaciones microgliales	35
Resultados	36
■ La dieta alta en grasa induce ganancia de peso	36
■ LPS en P3 evitó el incremento de glucosa, insulina y del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) en sangre	36
■ La interacción de LPS con dietas altas en grasa provocó un decremento de IRS2 en el grupo LPS+DAG	37
■ La conducta innata de construcción de nido no fue afectada por la dieta alta en grasa y las inyecciones pos-natales con LPS	37
■ La dieta alta en grasa provocó deterioro en la memoria de trabajo espacial	38
■ El LPS en el día pos-natal 3 más el consumo de una dieta alta en grasa no provocó una diferencia en el número de células en el hilus del giro dentado	39
■ El LPS provocó resistencia a cambios morfológicos en microglía dado por la dieta alta en grasa	40
■ Las citocinas proinflamatorias inducidas por la dieta alta en grasa decrementaron con la exposición postnatal a LPS	40
■ Existen dos poblaciones de microglía dado por la morfología	43
■ Poblaciones de microglía en los distintos grupos	43
■ Las poblaciones de microglía son homogéneas	44
Discusión	45
Conclusión	51
Bibliografía	52
Anexos	64

-
- **Anexo I** Vargas-Rodríguez, I., Reyes-Castro, L. A., Pacheco-López, G., Lomas-Soria, C., Zambrano, E., Díaz-Ruíz, A., & Diaz-Cintra, S. (2022). POSTNATAL EXPOSURE TO LIPOPOLYSACCHARIDE COMBINED WITH HIGH-FAT DIET CONSUMPTION INDUCES IMMUNE TOLERANCE WITHOUT PREVENTION IN SPATIAL WORKING MEMORY IMPAIRMENT. *Behavioural Brain Research*, 113776.
 - **Anexo II** Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., Vargas-Rodríguez, I., & Díaz-Cintra, S. (2021). Oxidative stress, the immune response, synaptic plasticity, and cognition in transgenic models of Alzheimer disease. *Neurología (English Edition)*.
-

Agradecimientos institucionales

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Neurobiología (INB) por darme la oportunidad de realizar el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyar mis estudios de doctorado con la beca número 303696.

A la dirección general de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo de los proyectos de investigación PAPIIT No. IN204519.

CONACyT por el apoyo en el proyecto CB-255399.

A las unidades de apoyo del INB:

- Bioterio M.V.Z. José Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León
- Microscopía Elsa Nydia Hernández Ríos
- Análisis conductal Dra. Deisy Gasca Martínez

Por la asistencia en técnicas de histología por parte de M. en C. Azucena Aguilar Vázquez. Correcciones en inglés por Dra. Jessica González Norris y el Dr. Michael Conrad Jeziorski.

Al comité tutor conformado por la Dra. Aracelí Díaz Ruíz y el Dr. Mauricio Díaz Muñóz.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), la Dra. Elena Zambrano González, la Dra. Consuelo Lomas Soria y al Dr. Luis Antonio Reyes-Castro por el apoyo proporcionado en las dietas altas en grasa, cuantificaciones de insulina y RT-qPCRs, así como en la preparación del manuscrito del artículo.

Al Dr. Gustavo Pacheco López de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) en la preparación del manuscrito.

A la Dra. Ulrike Weber Stadlbauer de University of Zurich (UZH) por su asesoría técnica en el laberinto en Y y la administración de inmunogenos en desarrollo.

Agradecimientos personales

A mis padres por todo su apoyo en el transcurso del doctorado y por inculcarme pasión por las ciencias naturales.

A mis hermanos por el apoyo que me han brindado durante la realización de mis estudios.

A mi novia Gabriela por estar conmigo en los momentos más complicados del doctorado.

A la Dra. Sofía por su apoyo a lo largo de todo este trayecto, y sus valiosas enseñanzas en neurobiología.

Azu por su amistad y pláticas gratas de neurociencias.

A mis amigos por su gran amistad:

Luis por su apoyo académico indispensable para realización del proyecto de doctorado.

Israel por todos los gratos momentos y su apoyo en histología.

Zeus por todas tardes de pláticas amenas y su apoyo en estadística.

Erika por todo su apoyo en todos los proyectos realizados y por ser parte fundamental en todo los experimentos realizados durante el doctorado.

Rodrigo por sus enseñanzas en la extracción de hipocampo así como todas las pláticas amenas.

Laura por ser la iniciadora de esta trayectoria, ya que sin ella no hubiera llegado hasta aquí.

Iván por todas esas pláticas de memoria y aprendizaje.

Polet por sus pláticas e información de microglía, ideas tomadas para realización de esta tesis.

Berenice por las pláticas amenas de glía.

Paola por las horas de pláticas, así como sus valiosas críticas en los experimentos realizados.

Alex por las largas pláticas de una gran cantidad de temas en ciencias .

Zyanya por sus críticas valiosas en los modelos de respuesta inmune maternal.

Irma por sus conversaciones en neurociencias.

Roberta por todo su apoyo a largo del doctorado y sus valiosas críticas.

Ana por todas las pláticas amenas.

David por todo su apoyo.

Jovana por las pláticas en microglía.

Guille por las discusiones en varios temas.

Oliver por sus consejos en la optimización de código.

Raúl por sus enseñanzas en Python.

A mis compañeros de laboratorio: Martín, Paola, Jesús Mancilla, Jesús Andrade, Alejandro, Anallely, Nayeli, Oskar, Jaime.

Abstract

Microglia is a professional phagocyte of the immune system in the central nervous system (CNS), which can adapt its response to an immunogen depending on its concentration. If the concentration of an immunogen is low, its response will be increased upon a second presentation, i.e., microglial sensitization. On the other hand, if the concentration of the immunogen is high, its response is reduced before a second presentation, thus inducing a desensitization. The exacerbated response to a second exposure of the immunogen is called trained immunity, whereas the decreased response to a second exposure is called immunotolerance. Both sensitization/trained immunity and desensitization/immuno tolerance in the microglia in adulthood are maintained for a certain time. But if this response is induced in the first days of birth of the individual, these changes can persist throughout the life of the organism. The second event that unmasks sensitization or desensitization can also be triggered by diets, such as high-fat diets (HFD). However, there is little knowledge about the induction of immunotolerance by DAGs and their effect on the brain is null. We therefore investigated the effect of DAG-induced immunotolerance in a rat model previously desensitized with an immunogen (with lipopolysaccharide, a component of the cell wall of Gram-negative bacteria). We found that immunotolerance does not induce an increase in blood glucose and insulin concentration. Regarding the immune response, we found a decrease in the expression of pro-inflammatory cytokine mRNA and an increase in anti-inflammatory cytokine mRNA. The changes observed in both metabolism and immune response were not observed in the performance of the spatial working memory.

Resumen

La microglía es un fagocito profesional del sistema inmune en el sistema nervioso central (SNC), el cual puede adaptar su respuesta ante un inmunógeno dependiendo de su concentración. Si la concentración de un inmunógeno es baja su respuesta será incrementada ante una segunda presentación, es decir, la microglía se sensibiliza. En cambio, si la concentración del inmunógeno es alta su respuesta se reducirá ante una segunda presentación, induciendo así una desensibilización. A la respuesta exacerbada ante una segunda exposición del inmunógeno se le denomina inmunidad entrenada, en cambio a la respuesta decrementada ante una segunda exposición se le denomina inmuno tolerancia. Tanto la sensibilización/inmunidad entrenada como la desensibilización/inmuno tolerancia en la microglía en la adultez se mantiene por un tiempo determinado. Pero si esta respuesta se induce en los primeros días de nacimiento del individuo, estos cambios pueden perdurar a lo largo de la vida del organismo. El segundo evento que desenmascare la sensibilización o desensibilización también puede ser dado por dietas, como lo son las dietas altas en grasa (DAG). Sin embargo hay poco conocimiento sobre la inducción de la inmuno tolerancia dado por las DAG y su efecto en el cerebro es nulo. Por lo que investigamos el efecto de la inmuno tolerancia inducida por las DAG en un modelo de ratón previamente desensibilizado con un inmunógeno (con lipopolisacárido un componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas). Encontramos que la inmuno tolerancia no induce un incremento de la concentración de glucosa e insulina en sangre. En cuanto a la respuesta inmune encontramos un decremento en la expresión de RNAm de citocinas pro-inflamatorias y un incremento de RNAm de citocinas anti-inflamatorias. Los cambios observados tanto en metabolismo y respuesta inmune no fue observado en el desempeño de la memoria de trabajo espacial.

Resumen gráfico

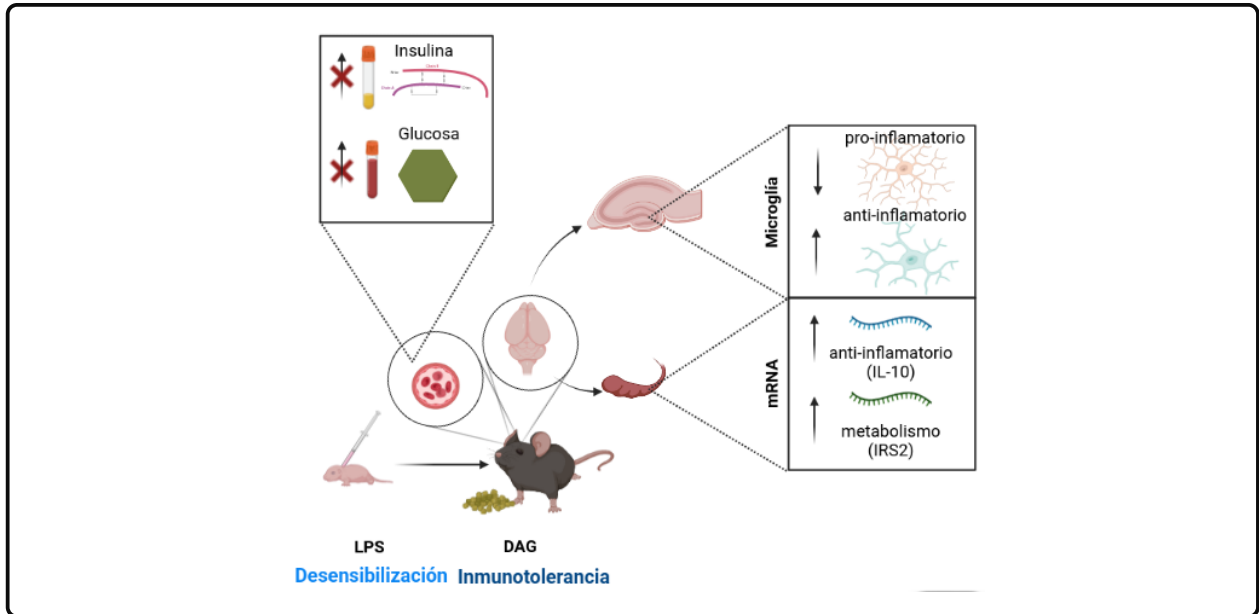


Figura 1: La desensibilización inducida en el día postnatal 3 con lipopolisacárido (LPS), provoca inmunotolerancia a las dietas altas en grasa (DAG) con una resistencia al incremento de insulina y glucosa.

Antecedentes

Macrófagos en Sistema Nervioso Central

Los macrófagos en el Sistema Nervioso Central (SNC) puede ser clasificados en dos tipos: 1) microglía que se localiza en el parénquima y 2) macrófagos asociados al SNC localizados en las meninges, espacio perivascular y plexos coroideos. Los macrófagos asociados al SNC se pueden clasificar en: 1) macrófagos asociados a bordes, macrófagos perivasculares, macrófagos subdurales leptomeningeales y macrófagos del plexo coroideo. Los macrófagos pueden provenir de dos fuentes: los que tienen un tiempo de vida prolongado que provienen del saco vitelino y los que tienen un tiempo de vida corto que provienen de la médula ósea [1].

Comunicación entre neuronas y microglía

La microglía se puede comunicar con las neuronas mediante comunicación: a) indirecta la cual es por **sistema de órganos** dado por neuronas del SNC o Sistema Ner-

vioso Periférico. El sistema inmune periférico puede influenciar a la microglía mediante la vía autónoma o factores solubles. Comunicación indirecta dada por **células intermedias**, como ocurre con los astrocitos que reciben y proveen comunicación entre neuronas y microglía. Comunicación indirecta mediada por la **vía de factores solubles** esto dado por citocinas, ATP, metabolitos purinérgicos y glutamato entre otros. Y por último puede ser por, b) interacciones directas entre **membrana-membrana** como lo es microglía con linfocitos T funcionando como presentadora de antígeno e incluso con neuronas. Dependiendo del compartimiento (ver tabla 1) donde la microglía haga contacto con la neurona es la función que lleva a cabo [2].

La microglía en el desarrollo del sistema nervioso

Los organismos de manera constante defienden su integridad biológica frente a una serie de agresiones del medio ambiente gracias a su sistema inmunitario (moléculas y

Compartimiento	Función neuronal
sinapsis	sinaptogenesis, plasticidad sináptica y eliminación de sinapsis
ramificación dendrítica	Formación de ramificaciones e integración de la señal dendrítica
cuerpo celular	supervivencia neuronal/muerte neuronal, migración/diferenciación
segmento inicial del axón	precursos neuronales, regulación metabólica, regulación genética generación de potenciales de acción, direccionar crecimiento axonal

Cuadro 1: Tipos de contactos directos entre neurona y microglía

linfocitos). Las células del sistema inmune pueden penetrar a los tejidos por las paredes de los capilares sanguíneos para combatir a los agentes infecciosos [3]. La microglía forma parte del sistema monocito-macrófago, se origina en la médula ósea y se distribuye por todo el SNC. Esta célula es más frecuente en la sustancia gris y supone del 5 al 20 % de toda la glía intersticial. En su citoplasma destacan lisosomas y cuerpos multivesiculares, los cuales están involucrados en fagocitar a neuronas degeneradas o restos de mielina. La microglía también contribuye a la regeneración y plasticidad neural. Así como también liberan factores de crecimiento polipeptídicos y citocinas que estimulan la proliferación de células endoteliales capilares del cerebro y cambios reactivos en los astrocitos [4]. En el desarrollo, desempeñan una función clave en el embrión secretando factores de crecimiento importantes para el feto. La microglía durante la gestación

y primeros días de nacimiento del organismo mantienen un aspecto redondeado y sin ramificaciones. Durante este periodo se encargan de eliminar el excedente de neuronas formadas durante este tiempo [5]. A medida que el SN madura, la necesidad de eliminar células en grandes cantidades desaparece y las células de la microglía se diferencian hasta alcanzar un aspecto con abundantes ramificaciones. Esta morfología ramificada se mantiene a lo largo de la vida del organismo, si es que no hay eventos subsecuentes como la exposición a inmunógenos. Desde el nacimiento hasta la adultez, estas células en el neocortex fagocitan a las células precursoras neuronales en etapas tardías y eliminan el exceso de sinapsis formadas entre neuronas [6]. Sin embargo, si ocurre un desafío inmunológico durante la gestación o los primeros días de nacimiento del organismo se alteran sus funciones homeostáticas, quedando sensibilizada a lo largo de la vi-

da del organismo. La sensibilización se mantiene latente y oculta, la cual no es capaz de observarse experimentalmente al cuantificar citocinas. Sin embargo, esta reprogramación de la microglía puede ser desenmascarada ante un segundo desafío inmune. A esta combinación de un desafío (por ejemplo, estrés, infección, etc) en la etapa perinatal y otro en el adulto para manifestar una enfermedad, se le llama la hipótesis de los dos golpes ("two hit") [7, 8].

Programación fetal

La exposición prenatal a infecciones influye posteriormente en la vida del individuo, aumentando la susceptibilidad a enfermedades. Esta susceptibilidad se ha demostrado en esquizofrenia, autismo, desórdenes bipolares y retardo mental. Además se ha propuesto como posible candidato a incrementar la susceptibilidad a Alzheimer y Parkinson [7–9]. En roedores expuestos a interleucina 1β (IL- 1β), se ha observado discapacidad cognitiva y aumento exacerbado de citocinas pro-inflamatorias ante un desafío inmunológico subsecuente en la adultez. Dichos eventos se han visto disminuidos si se inhibe la actividad de la microglía con el an-

tibiótico minociclina. El cual previene discapacidad cognitiva y la respuesta sensibilizada de IL- 1β [10]. Lo que llevo a pensar que un incremento de citocinas pro-inflamatorias en la madre del organismo durante la gestación, podría inducir un efecto parecido a la interacción directa del organismo con el inmunógeno. Dicho efecto se reprodujo al inducir una respuesta inmune en la madre con lipopolisacáridos (LPS) en un modelo de ratón. Donde se encontraron cambios en la morfología y expresión de citocinas como IL-6 e IL- 1β en microglía [11].

Receptores TLR (Toll like receptor)

El reconocimiento de inmunógenos mediado por la madre en etapas gestacionales es dada por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Dependiendo del inmunógeno es el receptor activado y la vía ejecutada. Los PRR reconocen estructuras conservadas de patógenos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estas estructuras conservadas pueden ser lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos [12]. Los receptores TLR reconocen los patrones que detectan pató-

genos, y hasta la fecha se han identificado 10 en humanos y 12 en ratones. Estos receptores son proteínas transmembranales tipo I compuestos de repeticiones ricas en leucina (LRRs), las cuales median el reconocimiento de PAMPs, dominios transmembranales y el receptor citoplásmico tipo toll de interleucina 1 (TIR). Estos receptores existen en forma de homodímeros y heterodímeros. Los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 TLR6 y TLR10 se encuentran en la membrana plasmática, mientras que los receptores TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 y TLR13 se encuentran en compartimientos endosomales [12]. Los receptores TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lipoproteínas, TLR3 RNA de doble cadena (dsRNA), TLR4 lipopolisacáridos (LPS), TLR5 flagelina, TLR7 y TLR8 RNA de cadena sencilla (ssRNA) y TLR9 DNA [13]. Al receptor TLR4 se le ha encontrado involucrado en procesos de neurodegeneración [14].

Memoria de la respuesta inmune innata

Anteriormente se pensaba que solo la respuesta inmune adaptativa tenía memoria, sin embargo recientemente se descubrió

que la respuesta inmune innata también tiene cierta memoria. La memoria innata puede adquirir dos estados antagónicos: a) inmunidad entrenada o b) inmunotolerancia. La dosis del inmunógeno es determinante para producir cualquiera de estas dos respuestas, una dosis alta de inmunógeno induce tolerancia, mientras que la dosis baja favorece la inmunidad entrenada [15]. La memoria de la respuesta inmune innata a diferencia de la adaptativa no depende de arreglos del genoma, diversidad y selección clonal. Depende de 1) adaptaciones en la cromatina que modulan la accesibilidad de la maquinaria de transcripción (epigenéticos) y 2) modificaciones en las vías metabólicas [16].

Diferencia entre sensibilización e inmunidad entrenada de microglía

La inmunidad entrenada o memoria inmune innata se refiere a cuando monocitos o macrófagos que estuvieron en contacto un tiempo corto con un inmunoestimulador, responden con una producción aumentada de citocinas proinflamatoria cuando entran

en contacto con un segundo inmunostimulador. La sensibilización involucra la movilización de receptores preformados del citoplasma a la membrana plasmática, lo que induce cambios en el número de receptores o la afinidad de estos. En la inmunidad entrenada están involucrados cambios epigenéticos en vías inmunes o metabólicas [17]. Sin embargo de acuerdo a otros autores, la sensibilización puede ser el paso previo a la inmunidad entrenada. Es decir, un primer estímulo induce la sensibilización y ante un segundo estímulo se da la inmunidad entrenada [18].

Características de la inmunidad entrenada

La respuesta inmune entrenada o memoria inmune innata se da en células mieloides, natural killer (NK) y células linfoides innatas (ILCs). A diferencia de la memoria de la respuesta inmune adaptativa, ésta no tiene re arreglo génico y proliferación de clones de linfocitos específicos hacia un antígeno. El incremento en la respuesta por la inmunidad entrenada es mediado por cambios sostenidos en los programas de transcripción debido a modificaciones epigenéticas. Dichas

modificaciones pueden perdurar en la célula de semanas a meses. Estos cambios epigenéticos son dados por modificaciones de histonas, metilación de DNA, modulación de miRNAs y expresión de RNA largos no codificantes [19].

Características de la sensibilización de microglía

La microglía sensibilizada tiene una respuesta hipersensitiva a un estímulo proinflamatorio, y se caracteriza por tener los marcadores de superficie celular *Itgax*, *Lgals3*, *Axl*, *Clec7a*, *MHCII* y *Cxcr4*. Estos marcadores están relacionados con las vías de inmunidad, fagocitosis, lisosomal, fosforilación oxidativa y presentación de antígenos [20]. Una infección periférica transitoria o una exposición crónica a bajas concentraciones de patógenos pueden sensibilizar a la microglía. Es decir, no cualquier concentración de inmunógeno la induce [21]. A partir del día gestacional 8.5 del desarrollo hasta el día 14 postnatal la microglía puede ser sensibilizada lo que perdure la vida del organismo [7]. En la adultez la respuesta inmune basal de la microglía sensibilizada en gestación o en los primeros días postnatales no es

diferenciable de la microglía de organismos no sensibilizados. Hasta que se desenmascara con un segundo desafío inmunológico a la microglía sensibilizada con inmunógenos es que se puede apreciar un incremento exacerbado de citocinas pro-inflamatorias [22, 23].

Entrenamiento de microglía

La microglía puede ser entrenada con inmunógenos como el lipopolisacárido (LPS) y ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C). Estos inmunógenos activan receptores TLR de la respuesta inmune innata e inducen la producción de citocinas proinflamatorias. El LPS es un componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas que activa receptores TLR4. Mientras que poli I:C es un polímero sintético análogo de RNA de doble cadena (dsRNA) que es reconocido por el receptor TLR3 y produce una respuesta inflamatoria parecida a la de un virus [24].

Además de la concentración, el tiempo en que se da la respuesta inmune durante la etapa prenatal es determinante. Por ejemplo, la administración de poli I:C en etapas medias del embarazo en ratones C57BL/6J (DG9) tiene consecuencias en la conduc-

ta del animal, como una disminución en la exploración. En cambio en etapas tardías (DG17) la descendencia no presentan cambios en los tiempos de exploración. Esto aún cuando en ambas etapas hay un aumento de citocinas proinflamatorias. Posiblemente porque en la etapa media de la gestación, poli I:C provoca una disminución de la neurogénesis, pero no así en etapas tardías. La exposición de poli I:C en ambas etapas no inducen diferencias en la morfología de sus neuronas y astrocitos [25].

Los macrófagos de la descendencia de ratones a los que se les administró poli (I:C) en etapa gestacional media (DG12.5) en un medio con LPS o en combinación con IFN- γ incrementa la concentración de IL-12 (p40). Además de sobreexpresar CCL3 en condiciones basales [26].

Desensibilización de la microglía

La inducción de la desensibilización puede ocurrir por la estimulación con una dosis alta de inmunógeno o múltiples dosis, siendo el LPS uno de los inmunógenos que la inducen con mayor facilidad.

La desensibilización se caracteriza por un decremento de la activación de NF- κ B y la

expresión de ICAM1. [18].

Tolerancia de la microglía

La inmuno tolerancia es una respuesta inmune suprimida hacia un segundo estímulo y requiere de un estado previo de desensibilización [18]. La cual se caracteriza por una disminución en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ y con un aumento de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 [27].

Metabolismo de la respuesta inmune innata

La vía de señalización de PI3K-mTOR está involucrada en la inducción de la respuesta inmune entrenada. Esta vía induce un proceso anabólico, el cual es requerido para mantener la demanda de recursos y energía que la célula requiere para llevar a

cabo la producción de citocinas, péptidos antimicrobianos y otros mediadores de defensa. Mientras que en la inmuno tolerancia no es claro, se ha sugerido que la vía catabólica AMPK podría ser la involucrada. Esto debido a que su actividad induce una reducción en los niveles de energía de la célula, así como mediar el mantenimiento y reparación de células afectadas.

mTOR puede ser inhibido con metformina, mientras que el sensor de energía AMPK lo puede ser mediante restricción calórica [15]. En la inmunidad entrenada hay incremento de la glicolisis y β -oxidación, para proveer la energía necesaria para montar los mecanismos de defensas contra patógenos. Los metabolitos actúan como moléculas de señalización, cofactores y substratos que modulan la actividad de enzimas que modifican la cromatina [16].

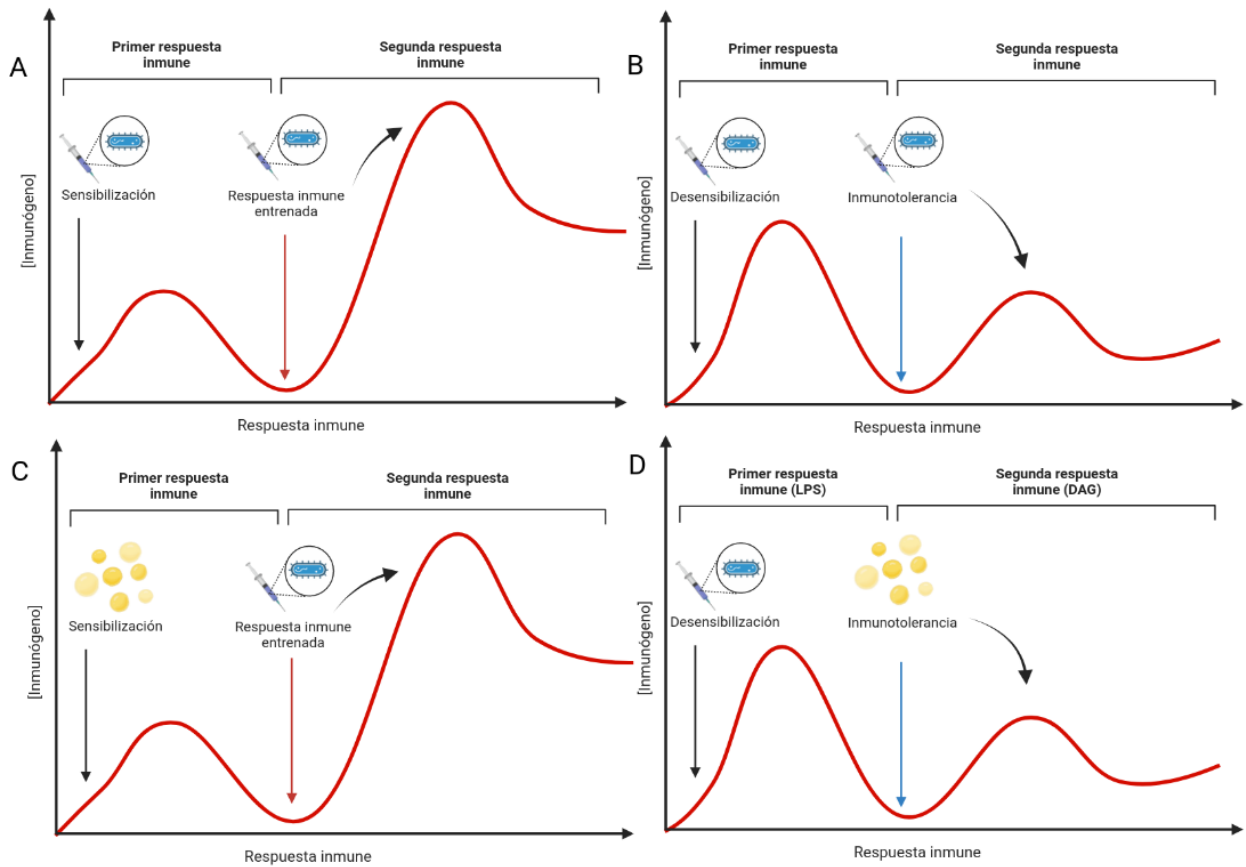


Figura 2: La memoria de la respuesta inmune innata, puede ser sensibilización seguido de una inmunidad entrenada como se muestra en A y C o desensibilización seguido de inmunotolerancia como se muestra en B y D. Las flechas rojas representan la inducción de la inmunidad entrenada mientras las flechas azules la inducción de la inmuno tolerancia.

Sustrato 2 del receptor a insulina (IRS2)

La insulina es secretada por las células- β en los islotes de Langerhans del páncreas, la cual regula el metabolismo anabólico de glucosa, lípidos y amino ácidos. Esta hormona regula el metabolismo de la mayoría de las células mediante su receptor (IR) y otras moléculas como el sustrato del receptor a insulina 1 y 2 (IRS1 y IRS2). Se ha visto en ratones que la eliminación de la expresión de IRS2 (IRS2^{-/-}) induce resistencia a la insulina y su expresión se incrementa ante el consumo de dietas altas en grasa (DAG) [28]. Aún cuando ante el consumo de DAG se mantiene incrementado IRS2, este disminuye su afinidad por el receptor a insulina, por las fosforilaciones serina/treonina mediadas por la vía IKK/NF- κ B activada por TLR4 [29, 30]. Además puede sufrir acetilaciones por la activación de la acetiltransferasa P300 mediada por la endotoxemia metabólica e inducir inhibición de la señalización corriente abajo [30, 31]. Interleucinas anti-inflamatorias como IL-4 [32] e IL-10 [33] inducen la activación de IRS2. Y al bloquear IL-10 se incrementan las fosfo-

rilaciones de serinas/treoninas en IRS2, lo cual sugiere que podrían ser protectores de la inactivación de esta molécula dado por las citocinas pro-inflamatorias.

Obesidad y dietas altas en grasa

La obesidad es uno de los grandes problemas que acontece hoy en día a nivel mundial, y uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas. Aunque el incremento de peso es dado por un sobre consumo de alimento, aún existe un intenso debate sobre que macronutriente es el responsable de dicho sobre consumo [34]. En la hipótesis del consumo de proteína (conocido en inglés como protein leverage PLH) propone que los organismos consumen alimentos hasta satisfacer la demanda proteica requerida. Lo cual se ha observado al analizar el consumo de dietas en humanos a lo largo de varios grupos de distintas nacionalidades. Donde se ha encontrado que todos consumen aproximadamente 16% de proteína, siendo el nutriente más costante. Lo cual sugiere que podría ser el mecanismo controlador [35]. El grupo de Speakman se preguntó si la proteína podría ser el macronutriente involucrado en el in-

cremento de peso. Por lo que utilizaron varias cepas de ratones alimentados con varias proporciones de carbohidratos, proteínas y grasas. Encontrando que la grasa es el macronutriente que induce un incremento de peso y no así la proteína. Sin embargo, el incremento de peso dado por la grasa no es lineal, su pico máximo es entre los 50 %-60 % de contenido [34].

Endotoxemia metabólica

La obesidad mediada por DAG es un factor de riesgo para el declive cognitivo, ya que puede promover un estado pro-inflamatorio crónico capaz de inducir neuroinflamación e inducir un perfil pro-inflamatorio en microglía. La alimentación alta en grasa en roedores ocasiona alteraciones en tareas dependientes del hipocampo, además de inducir un perfil pro-inflamatorio en la microglía [36]. Las DAG también producen un incremento en la concentración de LPS en el plasma proveniente de la microbiota endógena, a la cual se le denomina endotoxemia metabólica [37]. Este proceso es mediado por quilomicrones, decremento de la integridad de la barrera intestinal y la actividad de fosfatasa alcali-

na (enzima responsable del rompimiento de LPS en intestino) [38]. El porcentaje de grasa en la dieta es determinante en la cantidad de LPS de microbiota que es traslocado de intestino a sangre [39]. Una vez que el LPS llega a sangre puede ser reconocido por el receptor de superficie TLR4 así como a agregados endógenos y proteínas oxidadas produciendo una inflamación crónica [14]. Al mutar al co-receptor CD14 [37] y al receptor TLR4 [40] en ratones alimentados con DAG las concentraciones de glucosa e insulina, así como la concentración de citocinas pro-inflamatorias no se incrementan como en ratones controles. Por lo que se ha propuesto que el incremento de glucosa, insulina y citocinas pro-inflamatorias dados por las DAG son dependientes de la vía de reconocimiento de LPS mediada por CD14/TLR4 [37].

Disbiosis

La disbiosis se refiere a una alteración de la microbiota del individuo [41]. La cual puede ser inducida por DAG. Dicha dieta favorece la proliferación de una mayor proporción de bacterias Gram-negativas en intestino [42]. Lo cual es exacerbado por su capacidad de alterar la cantidad de LPS

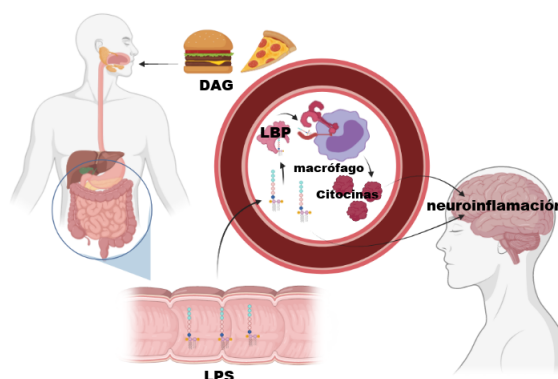


Figura 3: La endotoxemia metabólica incrementa el paso de LPS de intestino a sangre mediado por la proteína de unión a LPS (LBP) y macrófagos. Este paso de LPS provoca un incremento de citocinas proinflamatorias en periferia. Las cuales son capaces de llegar a cerebro e inducir una respuesta pro-inflamatoria mediada por microglía.

(componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas) de microbiota que es traslocado de intestino a sangre [37].

Memoria de reconocimiento espacial

La memoria a corto plazo es el almacenamiento temporal de la memoria. La memoria de trabajo es un tipo de memoria a corto plazo, que se diferencia de esta por la capacidad de almacenar temporalmente y procesar la información para completar un objetivo [43]. En experimentos con animales, este tipo de memoria se define como la que es capaz de retener la información durante una sola sesión, mientras que

la memoria de referencia puede permanecer a lo largo de varias sesiones o incluso durante todo el experimento [44]. La memoria de trabajo depende mayoritariamente entre la sincronía de la corteza prefrontal medial (mPFC) y de hipocampo (HC. Esta sincronía se da por ritmos theta entre HC dorsal (dHC) y HC ventral (vHC) con la mPFC. Sin embargo, solo se conocen proyecciones excitatorias directas de CA1 ventral a mPFC [45]. El dHC se conecta indirectamente a mPFC mediante otras estructuras como el núcleo reuniens del talamo ventral medial (Re), el cual participa sincronizando a dHC con mPFC [46]. Los déficits más robustos en la memoria de trabajo se han encontrado al dañar o inactivar

el dHC. Mientras que al dañar o inactivar el vHC se afecta la memoria de trabajo olfatoria, contextual y de miedo. Es decir, el dHC está más involucrado en la navegación y aprendizaje, mientras que el vHC es más importante en las emociones y olfacción [45]. Las proyecciones del giro dentado (DG) al cuerno de Amón 3 (CA3) del hipocampo a través de las fibras musgosas se han considerado como críticas para las tareas de memoria de trabajo. Ya que estas soportan la memoria al promover la generación de distintos patrones de disparo hipocampales, así como las vías directas e indirectas recurrentes entre DG-CA3 que forman el circuito de asociación. El circuito de asociación se ha sugerido como crítico para retener la memoria de trabajo espacial. Ya que al lesionar el DG se ven comprometidos los patrones de disparo espaciales de CA3, esto dado por la afectación en las fibras musgosas que pasan por el hilus del DG [43].

Efecto de las dietas altas en grasa en cerebro

La exposición prolongada de dietas altas en grasa provoca el incremento de astrocitos y microglía en ciertas estructuras como

hipotalamo. Efecto acompañado de un aumento de citocinas pro-inflamatorias [47], así como incremento en el tamaño de los procesos de microglía [48]. Si la DAG es consumida en la adolescencia pueden afectar distintos tipos de memoria, siendo la memoria de trabajo una de las más sensibles. Su consumo en el adulto no se ha encontrado que pueda decrementar el desempeño de memorias como la de trabajo espacial [49–51]. Las DAG aún sin inducir sobrepeso u obesidad en ratones adolescentes, pueden alterar la memoria de trabajo [52]. Los problemas de memoria relacionados al consumo de dietas de grasa puede ser causado por una disminución en las espinas dendríticas y sinapsis [48], así como la pérdida de la función entre HC y PFC mediado por receptores a glutamato [51]. La pérdida de estas espinas dendríticas puede estar relacionado con un cambio en el fenotipo de microglía, ya que la estimulación de estas con ácidos grasos como el palmítico, favorece la pérdida de espinas dendríticas [53]. El HC es más vulnerable a las dietas altas en grasa que otras estructuras como PFC e hipotálamo [49], siendo el hilus del DG el más sensible de inducir una respuesta inflamato-

ria [52]. Las dietas occidentales (las cuales tienen una cantidad alta en grasa) se les ha asociado con un menor desempeño en tareas cognitivas. Así como un factor de riesgo para desarrollar demencia en el envejecimien-

to. Sin embargo en estudios de cohorte recientes no se ha encontrado alguna relación entre el tipo de dieta y un deterioro cognitivo [54, 55].

Justificación

De acuerdo a la organización mundial de la salud la obesidad es uno de los principales problemas de salud hoy en día y que está asociada principalmente al porcentaje de grasa presente en la dieta [34]. Lo cual es un problema preocupante para México, ya que es uno de los países con mayor cantidad de personas con obesidad alcanzando el 28.9% de la población [56]. En México se atribuye un 75% de muertes y un 65% de incapacidades a las enfermedades no transmisibles relacionadas con la obesidad, por lo que los problemas asociados a obesidad es preocupante para el país ya que se estima un incremento de casos [57].

El consumo de dietas altas en grasa (DAG) se ha asociado en humanos con un decremento en el volumen del hipocampo, así como un factor de riesgo para desarrollar demencia en la vejez [58, 59]. Sin embargo, al modelar el efecto de las DAG en ratones. Se ha encontrado que su consumo solo tiene efecto en ventanas críticas como lo son la niñez y adolescencia. Donde pueden pro-

vocar neuroinflamación además de un bajo desempeño en memoria de trabajo espacial [48, 49, 51, 53]. Aunado a esto, se ha descrito que el efecto de las DAG puede ser modificado si la respuesta inmune innata se modifica. Como lo es la inmunotolerancia que induce resistencia al incremento en la concentración de glucosa y citocinas proinflamatorias en sangre [60]. Este efecto de las DAG inducido por la inmunotolerancia es desconocido en cerebro.

Además últimamente han surgido muchas discrepancias al respecto con las DAG, ya que algunos autores no han encontrada una relación entre el consumo de DAG y aumento de riesgo en demencia [54, 55]. Por lo que es importante esclarecer el origen de las discrepancias encontradas con las dietas altas en grasa. Nosotros proponemos que el estado previo del sistema inmune innato a la exposición de las dietas altas en grasa puede cambiar el curso de los efectos observados en estas dietas.

Hipótesis

La desensibilización de la respuesta inmune innata con LPS en el día postnatal 3 provocará inmuno tolerancia al consumo de dieta alta en grasa así como resistencia al incremento de insulina y glucosa sin protección del deterioro de la memoria de trabajo.

Objetivo general

Evaluar la memoria de trabajo espacial y la morfología de microglía en el hilus del giro dentado en ratones inyectados con LPS en el día postnatal 3 y alimentados con una dieta alta en grasa en la etapa juvenil, así como la concentración de insulina, glucosa, la expresión de mRNA de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y enzimas involucradas en el metabolismo de glucosa.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la dieta alta en grasa en la memoria de trabajo espacial
- Estimar las células totales y microglía en el hilus del giro dentado
- Analizar la morfología de microglía del hilus del giro dentado para determinar el perfil de la microglía
- Cuantificar insulina y glucosa de periferia
- Medir la expresión de mRNA de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias para determinar el perfil de la respuesta inmune

Metodología

Se utilizaron ratones machos C57BL/6J de 3 días de edad, bajo la licencia número 057 del Comité de Ética en la Investigación del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Para realizar el modelo de inmunotolerancia, se realizaron dos eventos en ventanas críticas: **Primer ventana crítica:** Desensibilización de microglía en el día posnatal 3 (P3) con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS vía subcutánea, utilizando LPS de *Escherichia coli* 0127:B8 (SIGMA). **Segunda ventana crítica:** Consumo de DAG durante 4 meses al día posnatal 21. La dieta empleada fue Chow 5001 como control (Laboratory Rodent Diet, con 13.5 % de kcal derivados grasa), la DAG fue preparada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) utilizando la formulación de Research Diets D12492 (con 60 % de kcal derivados de grasa). El diseño consistió en 4 grupos de 11 machos de camadas distintas

- P3 solución salina + P21 dieta control (Veh+Chow)
- P3 solución salina + P21 dieta alta en grasa (Veh+DAG)
- P3 LPS + P21 dieta control (LPS+Chow)
- P3 LPS + P21 dieta alta en grasa (LPS+DAG)

Se pesaron a los animales al destete, se mantuvieron en ciclo invertido 12 horas luz /oscuridad y posteriormente se pesaron cada semana, al término de 16 semanas con la DAG se realizaron las pruebas conductuales dependientes de hipocampo y posteriormente se hicieron histologías en el hilus del giro dentado y expresión de mRNA en hipocampo.

Memoria espacial a corto plazo por laberinto en Y

Se realizó en un laberinto de acrílico en forma de Y con claves espaciales en las paredes del cuarto donde se alojó a 30 luxes de intensidad.

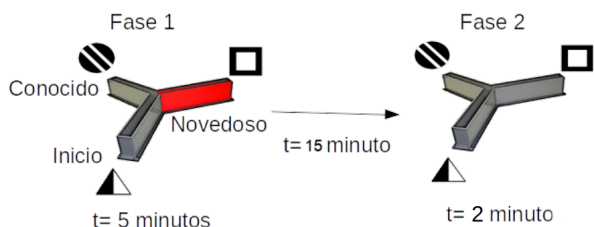


Figura 4: **Fase 1:** Se mantiene el brazo novedoso cerrado, ejemplificado de color rojo **Fase 2:** Los 3 brazos se mantienen abiertos y se cuantifica el tiempo que pasa el ratón en el brazo novedoso.

En la fase 1 se mantuvo cerrado un brazo al azar, al cual se le denominó brazo novedoso. Posteriormente se colocó al ratón aleatoriamente en uno de los dos brazos restantes al cual se le denominó brazo de inicio y al restante brazo conocido. Se dejó al ratón explorarlos durante 5 minutos. Posteriormente se retiró al ratón del laberinto y se mantuvo en su jaula durante 15 minutos. En la fase 2 se abrió el brazo novedoso y se dejó al ratón explorarlo durante 2 minutos. Aprovechando la tendencia de los ratones a explorar espacios novedosos si los recuerda [61, 62].

Construcción de nido

Es una conducta innata dependiente de hipocampo. Una hora antes del cambio a ciclo oscuro se colocó a cada ratón en una caja separada con 3 gramos de algodón, al

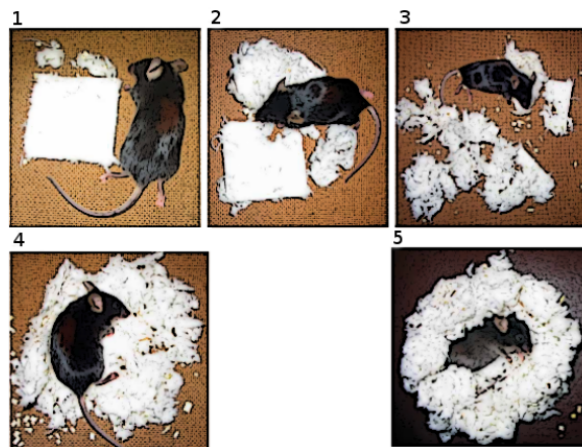


Figura 5: Escala de calificación en la construcción de nido. Imagen tomada de [63]

cambio de ciclo de luz se retiró el algodón que no fue utilizado por el ratón y se pesó para sacar el porcentaje de algodón no utilizado y se calificó de acuerdo a la siguiente escala [63, 64]:

1. Más del 90 % del algodón no fue rasgado
2. 50-90 % del algodón no fue rasgado
3. Del 50-90 % fue rasgado y esparcido por la caja
4. Más del 90 % fue rasgado y utilizado para hacer un nido, pero es plano
5. Más del 90 % del algodón fue utilizado para hacer el nido y tiene forma de cráter

Recolección de tejido

A 5 ratones de cada grupo se les inyectó 50 μ l de pentobarbital a una concentración de 125 mg.kg⁻¹ vía intravenosa, para luego ser perfundidos con solución salina y posteriormente fueron fijados con parformaldehído al 4 % en solución amortiguadora de fosfatos al 0.1M, se extrajo el cerebro el cual se dejó 24 horas en una solución fijadora a 4°C y posteriormente 3 días a 4°C en una solución de sacarosa 30 % como crioprotector. Los cerebros crioprotectados se congelaron y cortaron en criostato a 40 μ m en orientación sagital.

Recolección de suero

A 9 ratones de cada grupo se les extrajo sangre, la cual se les midió la concentración de glucosa con tiras reactivas (Accu-Check instant, Roche) y posteriormente se centrifugó A 3200 revoluciones por minuto durante 10 minutos para separar el suero, el cual fue congelado en ultracongelador hasta su posterior uso para la cuantificación de insulina por ELISA utilizando el kit (EZRMI-13 K Sigma-Aldrich). El cálculo de HOMA-IR (modelo homeostático para evaluar la resis-

tencia a la insulina) fue mediante la ecuación 1 anteriormente descrita [65–67], donde la concentración de glucosa es mmol*L⁻¹ y la insulina μ U*mL⁻¹.

$$HOMA - IR = \frac{glucosa * insulina}{22,5} \quad (1)$$

Histología

Tinción de Nissl

Se montaron los tejidos en laminillas y se hidrataron por 25 minutos en PBS, para luego pasarlas al colorante (violeta de cresilo). Las preparaciones teñidas se deshidrataron en alcohol al 50 %, 70 %, 80 % acidulado, 96 %, absoluto, xilol y una solución de xilol fresca. Las preparaciones teñidas y deshidratadas fueron montadas con resina.

Inmunohistoquímica

Se desenmascararon los epitopes en los tejidos cortados en sagital con buffer de citratos a pH=6 a 90°C por minutos, después se incubaron en H₂O₂ a 0.3 % en PBS con 0.1 triton X-100 y 0.5 % Tween 20 por 30 minutos, bloquearon con la solución descrita por [68]. Posteriormente los tejidos fueron incubados con Iba1 como marcador de mi-

croglía (PA5-18488 Invitrogen) a una concentración de 1×10^{-3} mg.mL⁻¹ (dilución 1:500) en la dilución descrita por [68], incubados con el sistema A+B y revelado con la reacción glucosa-oxidasa, la cual consiste en una solución de sulfato amonio níquel, cloruro de amonio, D-glucosa y diamino bencidina a la cual se le agrega glucosa oxidasa.

Análisis de transcripción reversa por reacción en cadena de la polimerasa

Se disectó el hipocampo de seis ratones por grupo, a los cuales se les extrajo RNA utilizando 1mL de TRIzol (invitrogenTM). La cantidad y calidad del RNA fue estimado por espectrofotometría a 260/280 nm, una cantidad constante de 1-3 μ g de RNA fue

transcrita utilizando transcriptasa reversa (RocheTM). Condiciones idénticas de qPCR fueron utilizadas para todos los genes, los cuales fueron normalizados utilizando el gen constitutivo Rrpl32 como control interno. La amplificación se realizó utilizando el instrumento de qPCR en tiempo real Light Cycler 2.0 (RocheTM), la mezcla maestra y pruebas de hidrólisis fueron utilizando un protocolo estándar (Biblioteca de pruebas universales, RocheTM). La activación de la polimerasa Taq DNA y desnaturalización de DNA se realizó a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 10 segundos de duración a 95°C, 30 segundos a 60 °C y 1 segundo a 72 °C. La qPCR obtenida se analizó por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [69]. Se utilizaron los siguientes cebadores:

Gen	Secuencia
G6PDH	F: 5'-ATCTTCACACCACTGCTGCA-3' R: 5'-CCGCGGCTGCCATATACATA-3'
GCK	F: 5'-ATCCGGGAAGAGAAGCAAGC-3' R: 5'-GATGAGGGACAGAGGGACCT-3'
PCK	F: 5'-TGCGGATCATGACTCGGATG-3' R: 5'-GGCACTTGATGAACTCCCCA-3'
IRS2	F: 5'-CGCCACAGTTCAGAGACCTT-3' R: 5'-CGCTTGGAATTGTGGGCAA-3'
TMEM119	F: 5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTG-3' R: 5'-CATCGGCATTTTGAACGAG-3'
IBA1	F: 5'-TGGGATCATCGAGGAATTG-3' R: 5'-GGATTTGCAGGGAGGAAAA-3'
CD14	F: 5'-AAAGAAACTGAAGCCTTTCTCG-3' R: 5'-AGCAACAAGCCAAGCACAC-3'
TLR4	F: 5'-GGACTCTGATCATGGCACTG-3' R: 5'-CTGATCCATGCATTGGTAGGT-3'
NRF2	F: 5'-CAACAGTATTTCTGCCGCTGT-3' R: 5'-CACAGGGAGGACTTTGTGAGT-3'
IL-4	F: 5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTG-3' R: 5'-CATCGGCATTTTGAACGAG-3'
IL-10	F: 5'-AGTTGACGGACCCCAAAG-3' R: 5'-AGCTGGATGCTCTCATCAGG-3'
TNF- α	F: 5'-GACGGTGAGAGCCAGAGG-3' R: 5'-TGGTGGAAGTGATCACGAGT-3'
IL-6	F: 5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3' R: 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
Rrpl32	F: 5'-GCTGCCATCTGTTTTACGG-3' R: 5'-TGACTGGTGCCTGATGAACT-3'

Cuadro 2: Cebadores utilizados para evaluar metabolismo de glucosa y respuesta inflamatoria.

Estereología

Para realizar la estereología se tomaron cortes sagitales de lateral 0.48 a 2.16, se tomaron 7 secciones con una separación de 240 μm entre cada una y con un grosor de 40 μm , se tiñeron con violeta de creylo y posteriormente se realizó la captura con el objetivo de 40x del hilus del giro dentado. Todos los campos se empalmaron con el plugin pairwise stitching [70] y se analizaron con el disector óptico de Ip [71] con algunas modificaciones para anexar la ecuación para el cálculo del número de pruebas por sección [72]. Se contaron 150 pruebas en un área total de 650983.885202138 μm^2 con una rejilla de 64 μm X 64 μm , y un disector óptico de 40 μm X 40 μm con altura de 40 μm .

$$A_{\text{distancia}} = \frac{\sum A_{1 \rightarrow n}}{150} \quad (2)$$

$$\eta_{\text{pruebas}} = \frac{A_{\text{sección}}}{A_{\text{distancia}}} \quad (3)$$

Ecuaciones para determinar el número de pruebas [72], la ecuación 2 se utilizó para determinar el factor $A_{\text{distancia}}$ suponiendo que se quiere 150 pruebas en $\sum A_1$ (sumatoria del área de las 7), posteriormente se utilizó la ecuación 3 para determinar el número

de pruebas que le corresponde a cada sección. Dando como resultado Se utilizaron 750 pruebas de conteo en 35 secciones por grupo.

$$N = \sum Q^- x \frac{1}{ssf} x \frac{1}{asf} x \frac{1}{tsf} \quad (4)$$

Ecuación 4 para estimar el número de células [71], donde:

$$\sum Q^- \quad (5)$$

es la suma de todas las células contadas en las pruebas del hilus del giro dentado

$$ssf = \frac{1}{6} \quad (6)$$

donde ssf = Fracción de muestreo de la sección, y la distancia entre secciones la cual es igual a $6m = \frac{240\mu\text{m}}{40\mu\text{m}}$, los 40 μm es el espesor del tejido y 240 μm es la distancia entre secciones, 7 secciones de separación.

$$asf = \frac{1600\mu\text{m}^2}{4096\mu\text{m}^2} \quad (7)$$

donde asf = Fracción de muestreo del área, 1600 μm^2 = área del disector óptico y 4096 μm^2 = área de la gradilla

$$tsf = \frac{40\mu\text{m}}{40\mu\text{m}} \quad (8)$$

Donde tsf = Fracción de muestreo del grosor, longitud del disector óptico = $40\mu\text{m}$ y grosor de la sección = $40\mu\text{m}$

$$\begin{aligned} precision &= \frac{CE^2}{CV^2} \\ CE &= \frac{\text{errorestandar}(x)}{\text{promedio}(x)} \\ CV &= \frac{\text{desviacionestandar}(x)}{\text{promedio}(x)} \end{aligned} \quad (9)$$

Ecuación utilizada para calcular la precisión [73, 74], donde el ratio del coeficiente

de error (CE) y el coeficiente de variación debe de ser menor a 0.5 [74], por lo que nos aseguramos que todas las estimaciones realizadas se mantuvieran por debajo de este valor. Las ecuaciones para estimar el tamaño de gradilla y disector óptico se insertaron (en negritas) en el código de Ip para ImageJ el cual sirve para generar el disector óptico [71].

```

//Optical Disector Grid.ijm
//simple imageJ implimentation of an optical disector grid for stereological counting
//code written by Christopher S Ward - 2013 for use in ImageJ/FIJI (Wayne Rasband)
//the code is distributed free of use, acknowledgements/citations appreciated if you
use/modify the code
//grid is created in center of image and is sized in pixels (modify code below)
//should be compatable with Çell Counter"plug-in
//user defined parameters
m=factor de conversión pixel/ $\mu$ m;
//Área total de la sumatoria de las secciones de la región de interes
areatotal=  $\sum A_1$ ;ecuación 5
ASTEP= $\frac{\sum A_{1 \rightarrow n}}{150}$ ;2
ASTEPM=ASTEP*(m*m);ecuación
//Obtención del tamaño de gradilla
grid=sqrt(ASTEPM);
//Obtener dimensiones de la imagen cargada en ImageJ
getDimensions(width, height, channels, slices, frames)
xlength=width;
ylength=height;
dy=ylength/grid;
dx=xlength/grid;
usergrid=22*m;
//Modificar setepx y stepy para mover el disector óptico por las gradillas
stepx=2;
stepy=4;
imagex=(grid/2)+((stepx-1)*grid);
imagey=(grid/2)+((stepy-1)*grid);

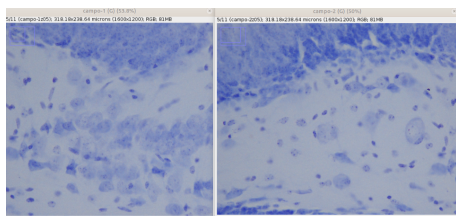
```

```
//Crear disectador óptico
Overlay.remove;
setColor("red");
Overlay.drawLine(imagex-usergrid*0.5,imagey-usergrid*1.5,
imagex-usergrid*0.5,imagey+usergrid*0.5);
Overlay.drawLine(imagex-usergrid*0.5,imagey+usergrid*0.5,
imagex+usergrid*0.5,imagey+usergrid*0.5);
Overlay.drawLine(imagex+usergrid*0.5,imagey+usergrid*0.5,
imagex+usergrid*0.5,imagey+usergrid*1.5);
Overlay.add;
setColor("green");
Overlay.drawLine(imagex-usergrid*0.5,imagey-usergrid*0.5,
imagex+usergrid*0.5,imagey-usergrid*0.5);
Overlay.drawLine(imagex+usergrid*0.5,imagey-usergrid*0.5,
imagex+usergrid*0.5,imagey+usergrid*0.5);
Overlay.add;
//Anexo de cuadrícula. Si se quiere inicio de cuadrícula aleatorio modificar
0 por variable aleatoria
//Grid x
for (i = 0; i < dy; i++) {
e=grid*i;
Overlay.add;
setColor("cyan");
```

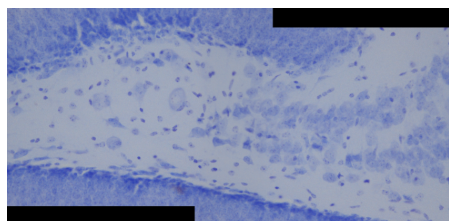
```
Overlay.drawLine(0,grid+e,xlength,grid+e);
Overlay.show
Overlay.add;}
//Grid y
for (i = 0; i < dx; i++) {
e=grid*i;
Overlay.add;
setColor("cyan");
Overlay.drawLine(grid+e,0,grid+e,ylength);
Overlay.show
Overlay.add;}
//Enumerar cuadrícula
for (i = 0; i < dx; i++) {
e=grid*i;
number=0+i;
setColor("red");
setFont("SansSerif", 40);
Overlay.drawString(number, ((grid-grid*2)+e)+
grid/9, grid/5);}
for (i = 0; i < dy; i++) {
e=grid*i;
number=0+i;
setColor("green");
setFont("SansSerif", 40);
Overlay.drawString(number, grid/1.2,
((grid-grid*2)+e)+grid/5);}
```

El plugin del disectador óptico que se utilizó tiene que ser empleado en capturas tomadas por un microscopio con platina motorizada, sin embargo al no contar con

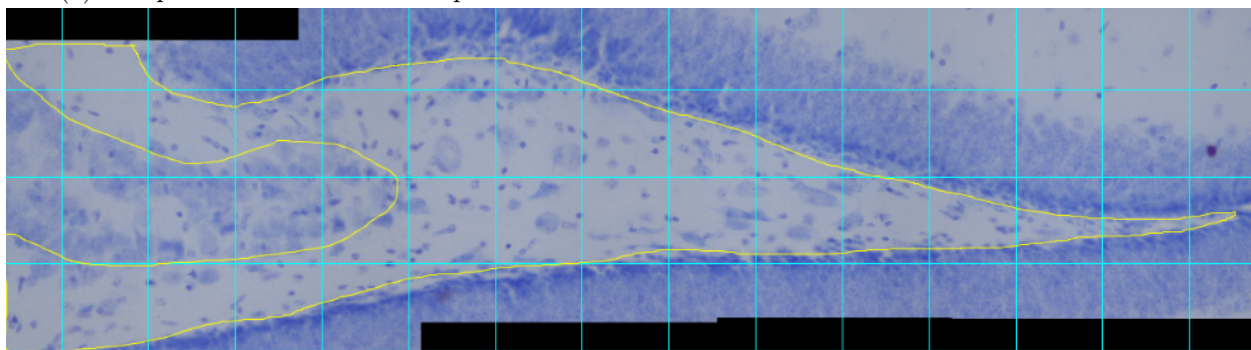
esta, se hicieron las reconstrucciones de la estructura de interés mediante empalme [75] siguiendo los pasos que se muestran a continuación:



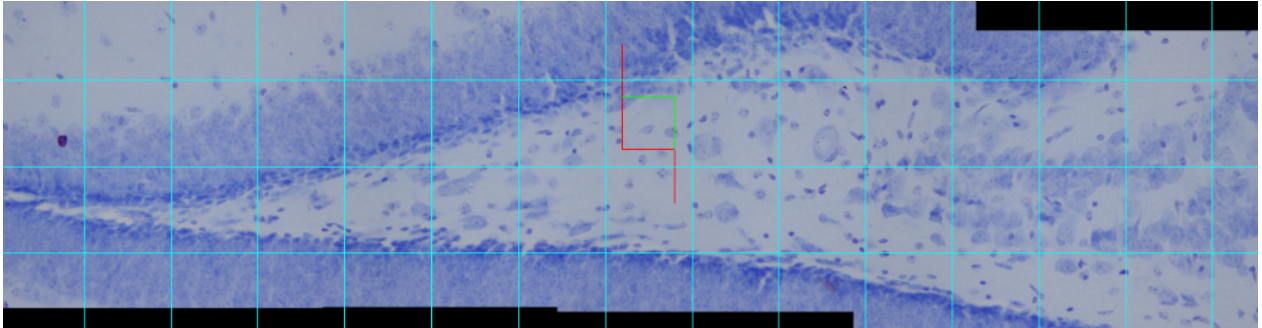
(a) Campos obtenidos a 40x en 8 planos en Z.



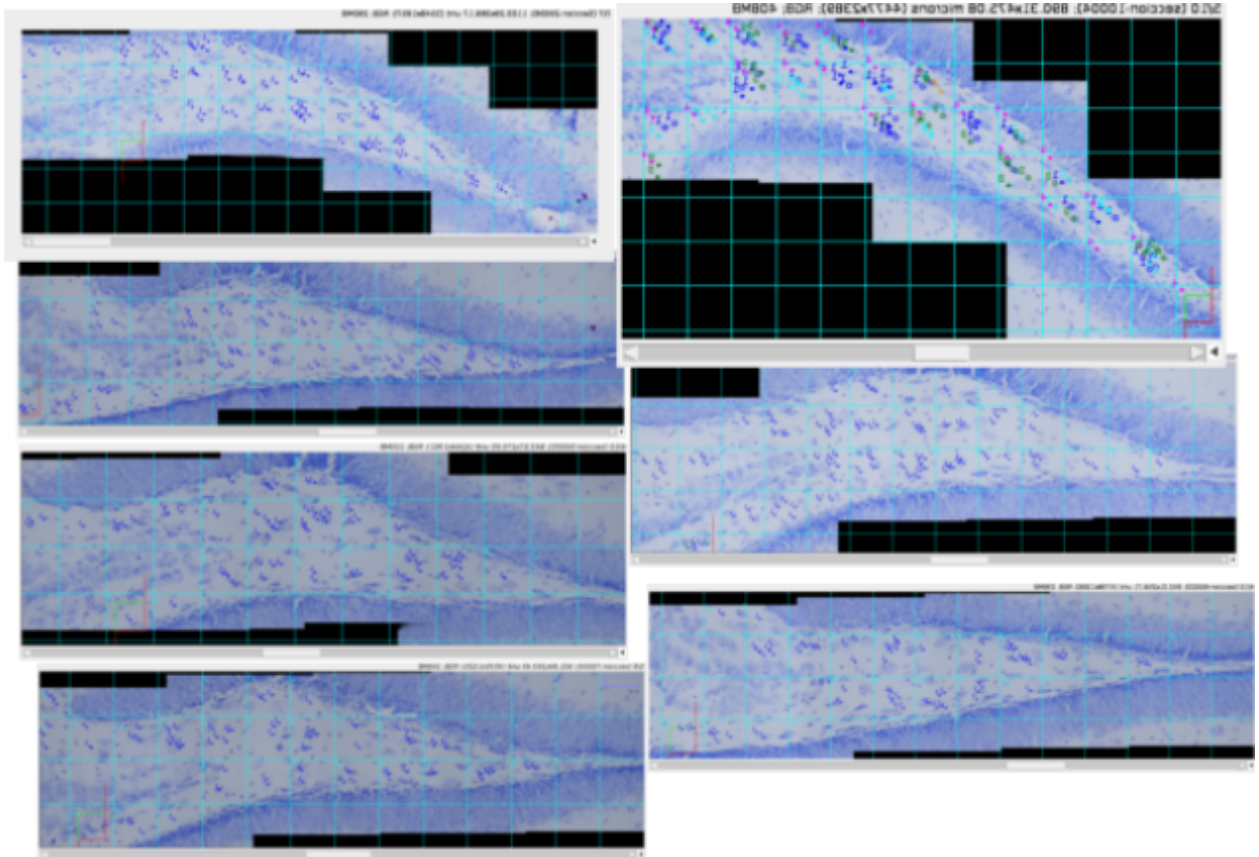
(b) Ensamble de campos mediante el plugin *pair-wise stitching*.



(c) Ejemplo de imágenes ensambladas para formar el hilus del giro dentado compuesto de 3 a 5 campos, dependiendo de la profundidad de la sección.



(a) Se contó cada espacio de la cuadrícula con el disector óptico.



(b) El conteo se realizó en todas las cuadrículas de las 7 secciones en la región de interés y planos en Z.

Después de haber obtenido la cantidad de células por sección con ayuda del disector óptico, se estimaron las células con la ecuación 4.

Crear funciones en R de las formulas obtenidas de [72]

```
se <- function(x) sd(x)/sqrt(length(x))
ce<-function(x) se(x)/mean(x)
cv<-function(x) sd(x)/mean(x)
precision<-function(x) (ce(x)**2)/(cv(x)**2)
grid.area<-4096
counting.frame.area<-1600
thicknes.tissue<-40
optical.height<-40
asf<-counting.frame.area/grid.area
ssf<-1/6
tsf<-optical.height/thicknes.tissue
estimated cells=1/(asf*tsf*ssf)
```

Estadística

Los análisis de glucosa, insulina, HOMA-IR, expresión de genes, estimación de células y número de microglías fue por ANOVA utilizando la biblioteca `car` de R 3.6.3. Para probar la homocedasticidad se utilizó la prueba de Levene con biblioteca `lawstat` y la normalidad con la prueba de Shapiro, utilizando la biblioteca `base`. Dado que los datos de HOMA-IR e insulina no pasaron la prueba de normalidad, se transformaron en escala logarítmica para realizar

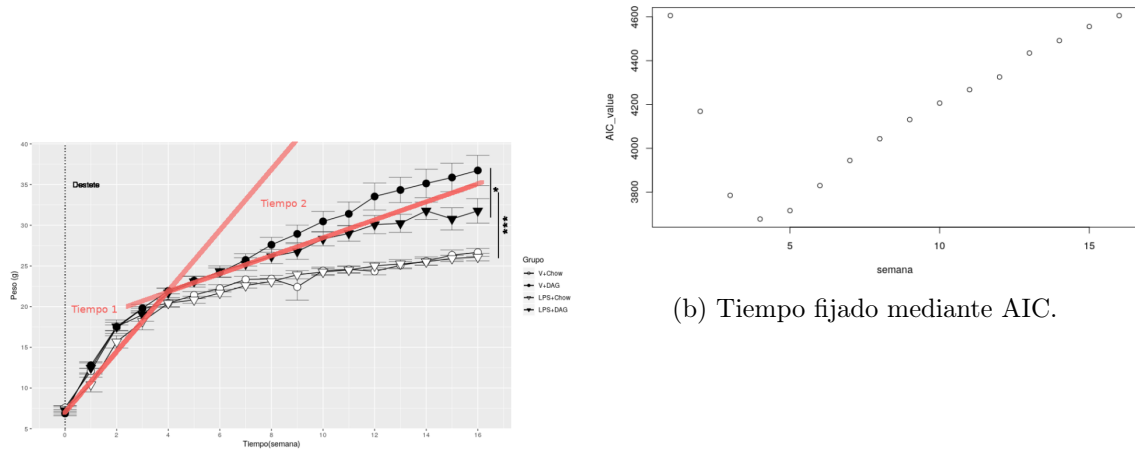
el análisis por ANOVA. Para el análisis de laberinto en Y se utilizó modelos lineales mixto. El p-valor de los efectos fijos fue calculado mediante ANOVA por el método de Satterthwaite y la comparación de grupos por Tukey HSD utilizando la biblioteca `emmeans`. El análisis del cambio de pesos se realizó mediante modelos lineales mixtos con dos pendientes. Se utilizó la biblioteca `lmerTest` para el modelo y `optimx` para el optimizador utilizado el método de Nelder-Mead (`nlminb`).

$$Y_{ij} = \beta_{0j} + \beta_1 t_{1ij} + \beta_2 t_{2ij} + R_{ij} \quad (10)$$

```

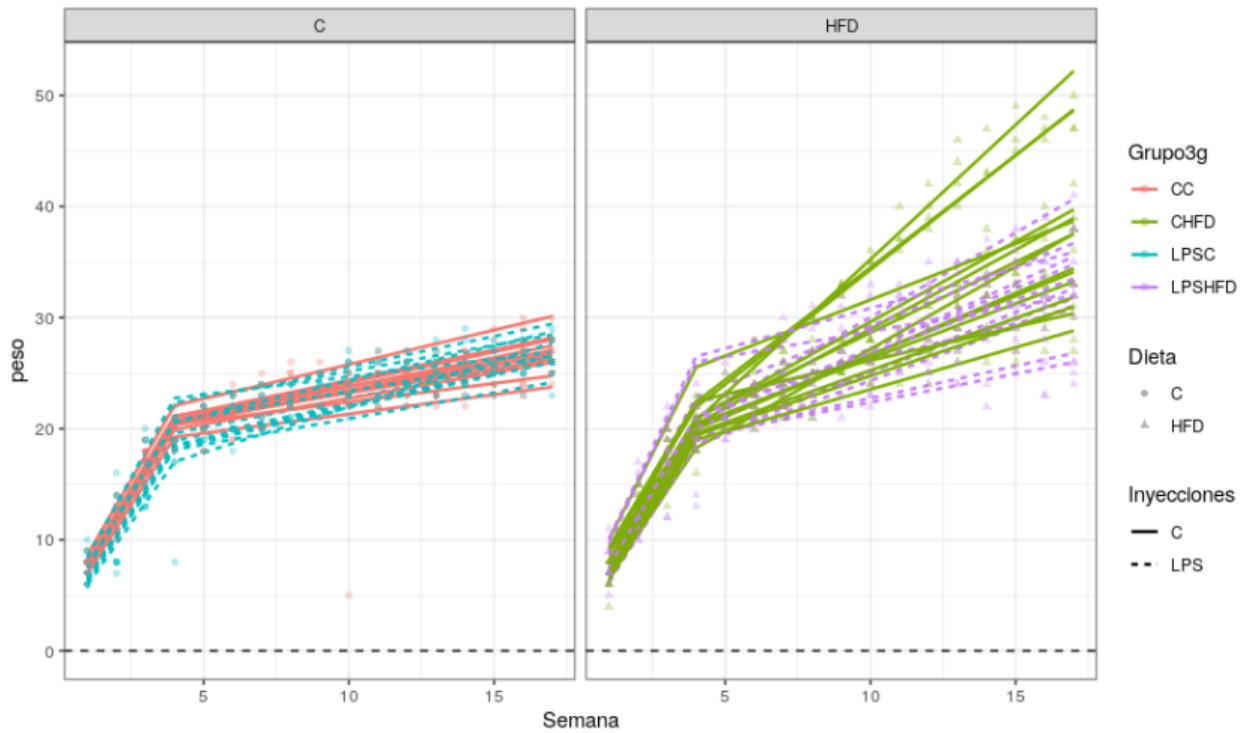
peso.lmer<-lmer(peso~Dieta*Tratamiento*(tempo1+tiempo2)+
               (tiempo1+tiempo2|raton), data=datos, REML=FALSE, control =
               lmerControl(optimizer='optimx', optCtrl=list(method='nlminb'))

```



(a) Ordenadas al origen tomadas.

(b) Tiempo fijado mediante AIC.



(c) En líneas predicción del modelo y en puntos los datos reales.

Figura 8: Se determinó la ordenada en el origen de la pendiente mediante criterios de información de Akaike a dos tiempos.

El análisis de microglía para 15 en C), D) y E) fue mediante modelos anidados, donde el nivel 0=microglía, nivel 1=sección

donde se encontró la microglía y nivel 2=ratón del cual proviene, de acuerdo a la ecuación basada en [76]:

$$Y_{ijk} = \beta_{0jk} + \beta_{1jk}t_{ijk} + R_{ijk} \quad (11)$$

```
parametro.lmer<-lmer(parametro~dieta*tratamiento+
(1|raton/seccion), data=data, REML = FALSE)
```

Análisis morfométrico

De las fotomicrografías se obtuvieron 1400 microglías (10 por sección es decir 70 por animal) las cuales se dibujaron a mano sobre la imagen real y posteriormente se convirtieron en binarias utilizando umbrales de ImageJ. Las imágenes binarias se transformaron a esqueletos utilizando la función *Skeletonize* de ImageJ y se analizaron mediante *Analyze Skeleton*, pasos que se muestran de forma representativa en la 15, de acuerdo a [77, 78]

Análisis de poblaciones microgliales

Los datos obtenidos se utilizaron en R para generar un marco de datos el cual se transformo a un marco de datos para citometría mediante la biblioteca *premesa*. Posteriormente se separó en poblaciones utilizando k-means con la biblioteca *flowClust*, la K se obtuvo por criterios de información Bayesianos (BIC) [79]. El análisis de diversidad de poblaciones con el índice de Shannon y Simpson se realizó en R con la biblioteca *vegan*.

Resultados

La dieta alta en grasa induce ganancia de peso

Al dar una DAG durante 16 semanas, se observó un incremento de peso dado por la dieta ($F_{1,44}=4.54$, $p=0.03$), sin efecto dado por el tratamiento ($F_{1,44}=2.68$, $p=0.14$). Sin embargo el grupo Veh+DAG ganó un incremento de peso estadísticamente significativa a la semana 4 con respecto el grupo control (Veh+CHOW). Mientras que el grupo LPS+DAG la obtuvo a las 7 semanas, es decir una diferencia de 3 semanas.

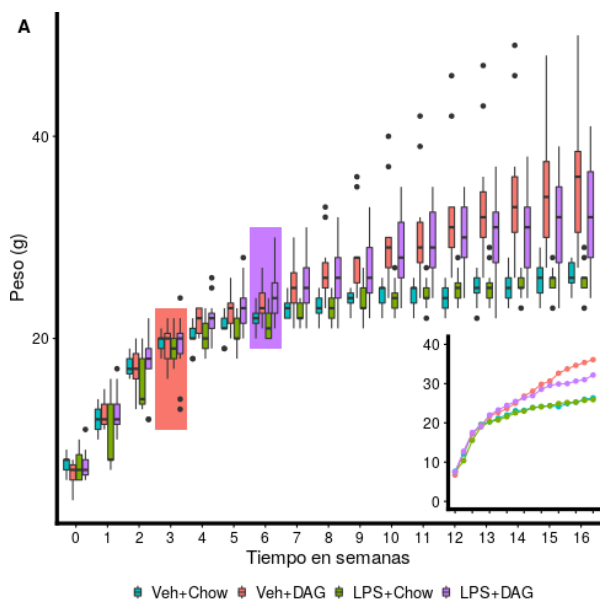


Figura 9: Ganancia de peso durante 16 semanas de alimentación con DAG y Chow.

Figura 9: Los datos son expresados en promedio \pm error estándar por semana después del destete al día p21. Veh+Chow ($n=11$), Veh+DAG($n=11$), LPS+Chow($n=11$) y LPS+DAG($n=11$). Los datos se analizaron por modelos lineales mixtos seguido de Tukey-HSD. En el recuadro de color rojo se observa un cambio significativo de Veh+DAG en comparación con Veh+Chow y LPS+Chow, en morado LPS+DAG en comparación de Veh+Chow y LPS+Chow.

El LPS en P3 evitó el incremento de glucosa, insulina y HOMA-IR en sangre

La DAG causó un incremento de glucosa ($F_{1,32}=15.94$, $p=0.0003$), insulina ($F_{1,32}=28.18$, $p=0.000008$) y HOMA-IR ($F_{1,32}=28.2$, $p=0.000008$). Aunque el tratamiento no causó una diferencia significativa ($F_{1,32}=0.24$, $p=0.62$), así como la interacción de tratamiento con dieta ($F_{1,32}=2.95$, $p=0.09$) en la glicemia, si hubo una diferencia significativa en el tratamiento dado por insulina ($F_{1,32}=11.3$, $p=0.002$) y HOMA-IR ($F_{1,32}=4.47$, $p=0.04$), así como con la interacción de tratamiento con dieta

en insulina ($F_{1,32}=7.11$, $p=0.01$) y HOMA-IR ($F_{1,32}=4.97$, $p=0.03$).

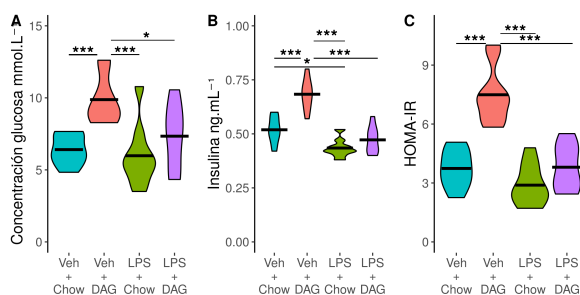


Figura 10: A) Concentración de glucosa B) concentración de insulina y C) HOMA-IR, datos expresados en promedio±error estándar. Veh+Chow (n=9), Veh+DAG(n=9), LPS+Chow(n=9) y LPS+DAG(n=9), analizados por ANOVA seguido de Tukey HSD.

La interacción de LPS con dietas altas en grasa provocó un decremento de IRS2 en el grupo LPS+DAG

Al determinar la expresión de mRNA en hipocampo de genes relacionados con el metabolismo de glucosa no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en glucocinasa (GCK) y protein cinasa C (PKC). Sin embargo si hubo un incremento significativo en la glucosa-6-fosfato (G6PDH) dado por el tratamiento ($F_{1,20}=6.98$, $p=0.01$). Así como un incremento significativo en el

Sustrato 2 del receptor a insulina (IRS2) dado por la dieta ($F_{1,20}=4.86$, $p=0.03$).

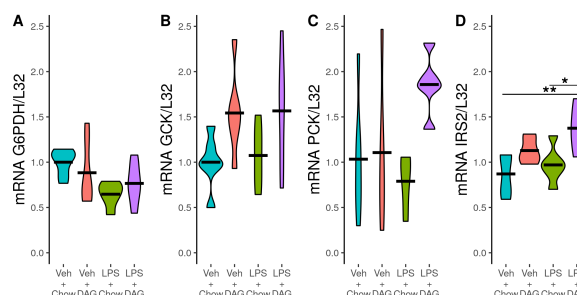


Figura 11: Expresión de mRNA en hipocampo de A) G6PDH, B) GCK, C) PCK y D) IRS2. Datos expresados en promedio±error estándar. Veh+Chow (n=6), Veh+DAG(n=6), LPS+Chow(n=6) y LPS+DAG(n=6), analizados por ANOVA seguido de Tukey HSD.

La conducta innata de construcción de nido no fue afectada por la dieta alta en grasa y las inyecciones pos-natales con LPS

Para evaluar el efecto de la dieta alta en grasa y de la inyecciones de LPS en día pos-natal 3, se realizó la conducta innata de construcción de nido. Esta conducta que es dependiente de hipocampo, no se encontró alguna alteración en el desempeño.

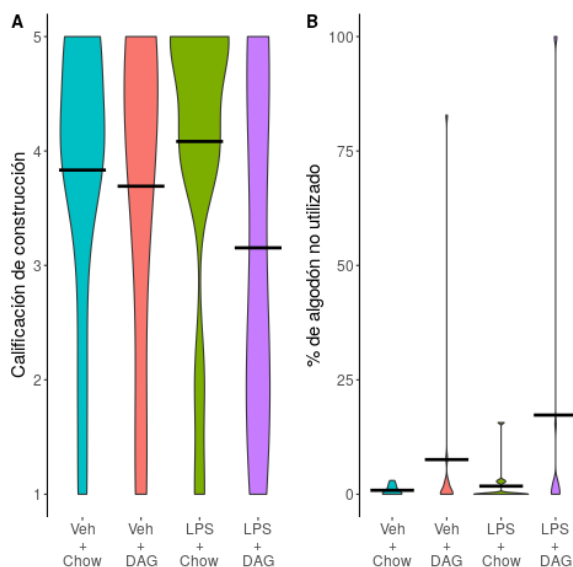


Figura 12: A) Promedio de las calificaciones obtenidas en la construcción de nido con error estándar. B) Porcentaje de algodón utilizado para la construcción del nido.

La dieta alta en grasa provocó deterioro en la memoria de trabajo espacial

El tratamiento con LPS provocó una diferencia estadísticamente significativa a lo largo de la prueba ($F_{1,44}=5.22$, $p=0.02$). Así como la interacción entre LPS y la dieta ($F_{1,44}=5.7$, $p=0.02$). Sin embargo la dieta no provocó una diferencia significativa a lo largo del tiempo ($F_{1,44}=1.73$, $p=.19$) en el

brazo novedoso a los 60, 90 y 120 segundos. Los ratones LPS+DAG pasaron menos tiempo en el brazo novedoso con respecto los controles (Veh+Chow y LPS+Chow). A los 120 segundos solo el grupo VEH+DAG pasó menos tiempo en el brazo novedoso con respecto los grupos controles.

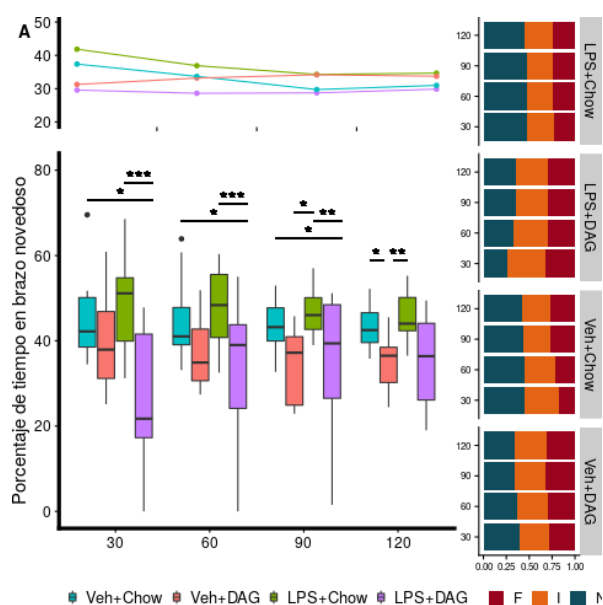


Figura 13: Porcentaje de tiempo que pasaron los ratones en el brazo novedoso del laberinto en Y. Datos expresados en promedio \pm error estándar y proporciones de tiempo en cada brazo por grupo Veh+Chow (n=11), Veh+DAG.(n=11), LPS+Chow(n=11) y LPS+DAG(n=11). Los datos se analizaron con modelos lineales mixtos vía ANOVA seguido de Tukey HSD. El panel derecho muestra las proporciones de preferencia por brazo familiar (F), inicio (I) y novedoso (N).

La interacción LPS+DAG provocó una diferencia significativa en el recorrido total en el laberinto en Y ($F_{1,44}=4.63$, $p=0.003$).

El LPS en el día pos-natal 3 más el consumo de una DAG no provocó una diferencia en el número de células en el hilus del giro dentado

Dado que el hilus del giro dentado del hipocampo es necesario para la memoria

de trabajo espacial y sensible a las dietas altas en grasa. Se estimó la cantidad de células totales en busca de una afectación en el número total. Encontrando Veh+Chow (10524 ± 242), Veh+DAG (12042 ± 381), LPS+Chow(11056 ± 491) and LPS+DAG (11384 ± 501), donde no hubo diferencia significativa dado por la dieta ($F_{1,16}=1.69$, $p=0.21$), y la interacción ($F_{1,16}=2.02$, $p=0.17$). Sin embargo hubo una diferencia significativa dada por efecto del tratamiento con LPS ($F_{1,16}=4.20$, $p=0.05$).

2

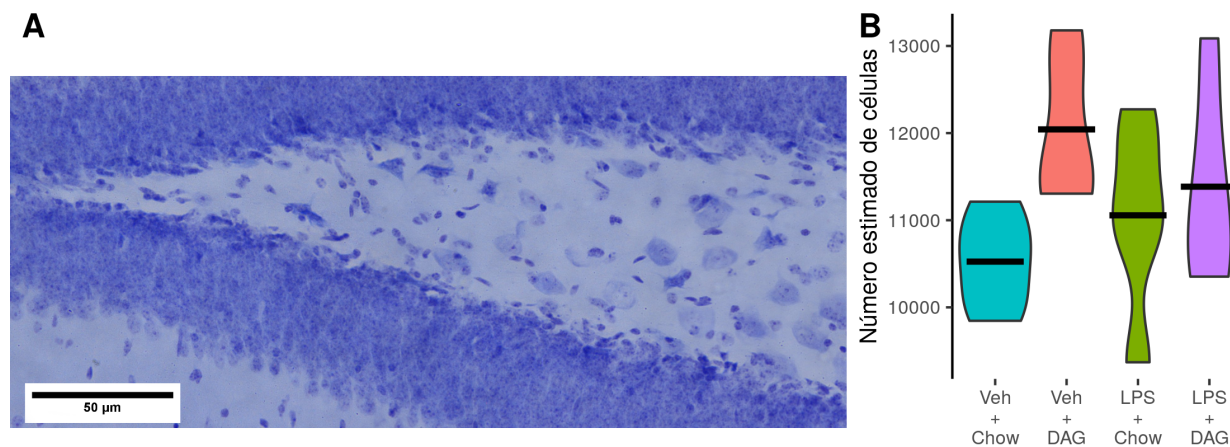


Figura 14: A) Fotomicrografía representativa a 40x de la reconstrucción del hilus del giro dentado teñido con Nissl. B) Número estimado de células en el hilus del giro dentado. Los datos son expresados en promedio±error estándar. Veh+Chow (n=5), Veh+DAG(n=5), LPS+Chow(n=5) y LPS+DAG(n=5), analizados por ANOVA de dos vías seguido de Tukey HSD.

El LPS provocó resistencia a cambios morfológicos en microglía dado por la DAG

Nosotros estimamos el número de microglías en el hilus del hipocampo, Veh+Chow (1650 ± 133), Veh+DAG (1742 ± 85), LPS+Chow (1653 ± 124) y LPS+DAG (1545 ± 86). No encontramos diferencias en el número de microglías dados por la dieta ($F_{1,16}=0.355$, $p=0.5597$) o la interacción de la dieta con el tratamiento ($F_{1,16}=0.833$, $p=0.3749$). Como está reportado la dieta provocó un incremento en la longitud total de los procesos de las microglías ($F_{1,20}=9.54$, $p=0.005$) y números de ramificaciones ($F_{1,20}=13.77$, $p=0.001$), pero no en los puntos finales ($F_{1,20}=1$, $p=0.3$). El LPS provocó una diferencia estadística en el tamaño total de los procesos ($F_{1,20}=9.54$, $p=0.005$), ramificaciones ($F_{1,20}=13.77$, $p=0.001$) y número de puntos finales ($F_{1,20}=4.43$, $p=0.04$). Sin embargo la interacción entre LPS+DAG solo causó una diferencia estadística en el tamaño total de los procesos ($F_{1,20}=6.03$, $p=0.02$). No hubo cambios en el número de ramificaciones ($F_{1,20}=2.58$, $p=0.1$) y puntos

finales ($F_{1,20}=0.21$, $p=0.64$).

Los expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por la DAG disminuyeron con la exposición postnatal a LPS

Debido a que la resistencia a cambios morfológicos observados en la microglía pudiera ser una característica de inmunotolerancia, evaluamos la expresión de mRNA de un perfil pro-inflamatorio TNF- α ($F_{1,23}=4.49$, $p=0.01$), IL-1 β ($F_{1,23}=3.34$, $p=0.04$) and IL-6 ($F_{1,23}=0.81$, $p=0.5$). Así como de un perfil anti-inflamatorio IL-4 ($F_{1,23}=2.75$, $p=0.07$), IL-10 ($F_{1,23}=8.11$, $p=0.001$) y NRF2 ($F_{1,23}=2.24$, $p=0.07$). Y el receptor TLR4 ($F_{1,23}=0.62$, $p=0.6$) y coreceptor CD14 ($F_{1,23}=13.35$, $p=0.001$) involucrados en el reconocimiento de LPS, Iba1 ($F_{1,23}=6.12$, $p=0.004$) y TMEM119 ($F_{1,23}=7.29$, $p=0.002$) como marcadores de microglía. LPS+DAG tuvo un incremento en la expresión de IL-10, CD14, Iba1 y TMEM119, lo que corresponde a un perfil anti-inflamatorio. En comparación con VEH+DAG, el cual tuvo un incremento en la expresión de un perfil pro-inflamatorio con TNF- α y IL-1 β .

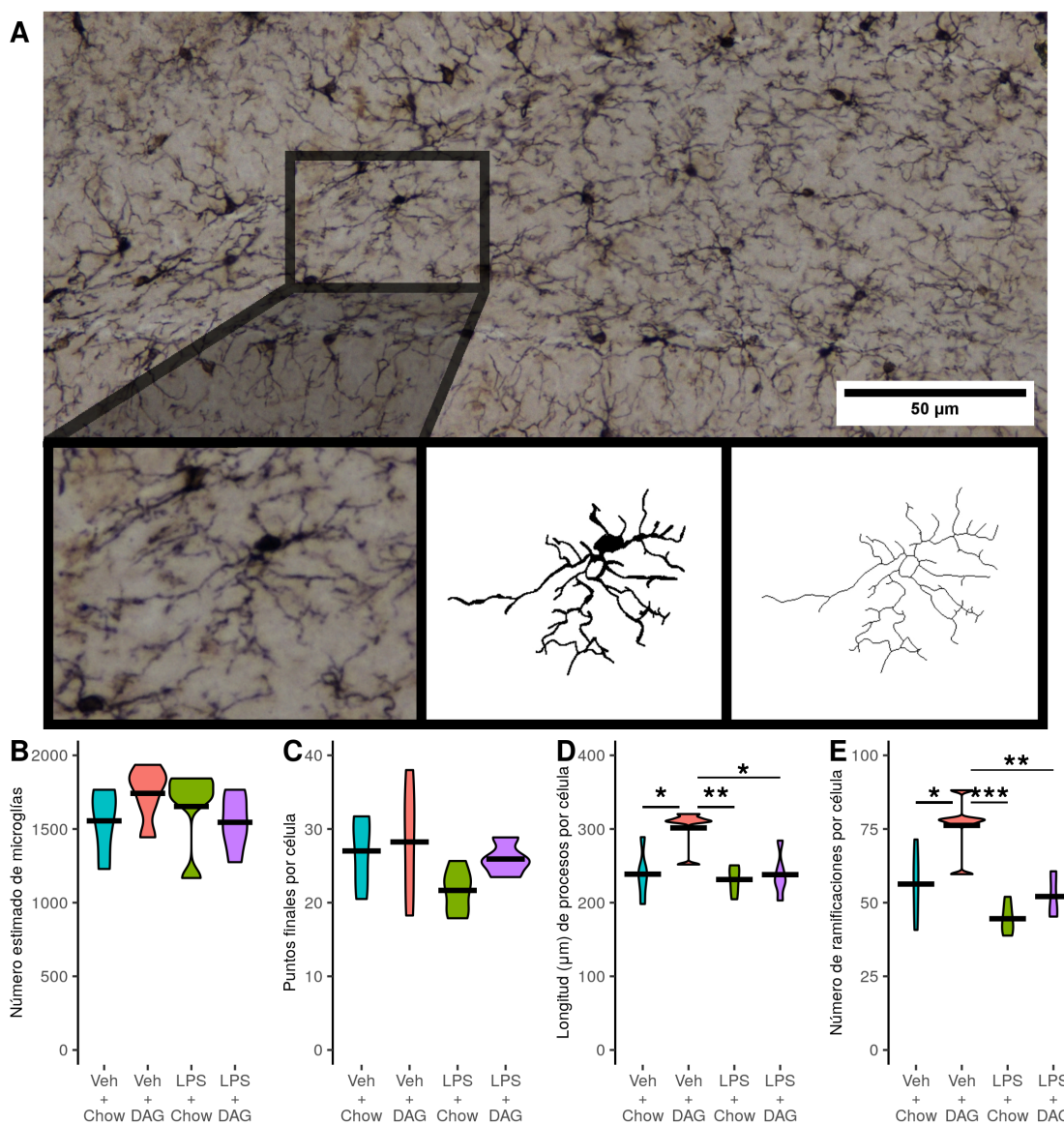


Figura 15: A) Fotomicrografía representativa de una inmunohistoquímica de Iba1 como marcador de microglía en el hilus del giro dentado. 70 microglías por ratón fueron convertidas en imágenes binarias, esqueleto y analizadas en ImageJ, B) Microglías estimadas en el hilus del giro dentado, C) Número de puntos finales en los procesos, D) Longitud total de los procesos, E) número de ramificaciones por célula. Número estimado de células en el hilus del giro dentado. Los datos son expresados en promedio±error estándar. Veh+Chow (n=5), Veh+DAG(n=5), LPS+Chow(n=5) y LPS+DAG(n=5), analizados por modelos lineales mixtos vía ANOVA seguido de Tukey HSD.

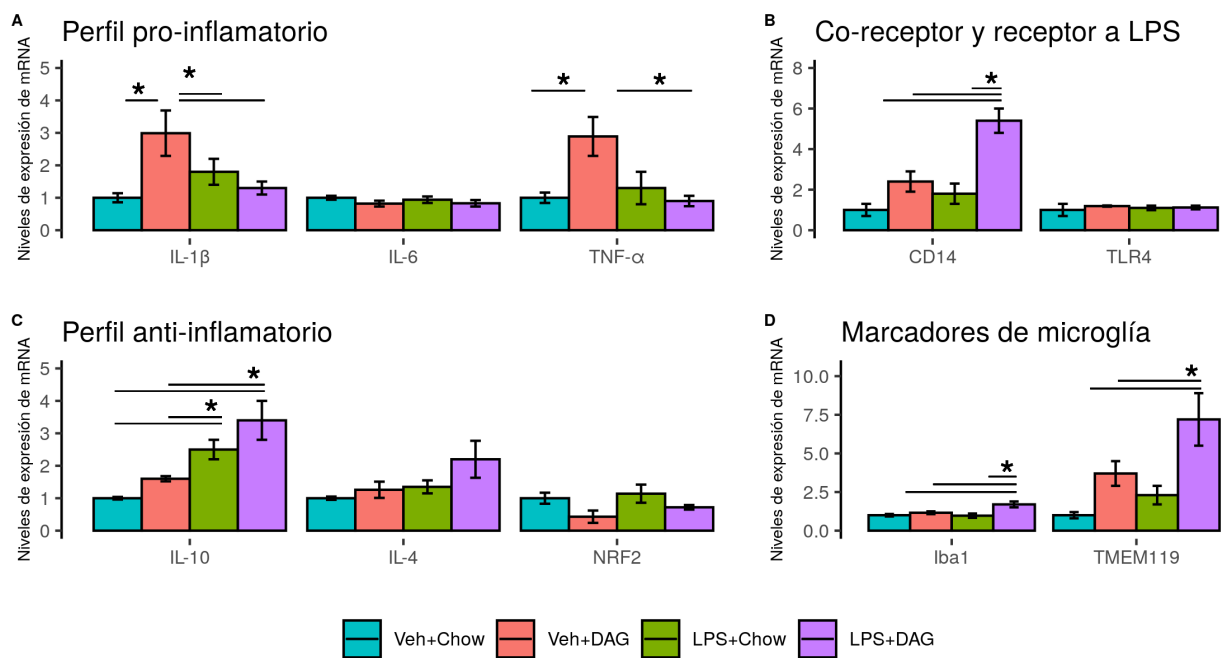


Figura 16: Expresión de mRNA en hipocampo de genes involucrados con la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria. Los datos son expresados en promedio \pm error estándar. Veh+Chow (n=6), Veh+DAG(n=6), LPS+Chow(n=6) y LPS+DAG(n=6), analizados por ANOVA seguido de Tukey HSD.

Existen dos poblaciones de microglía dado por la morfología

Al encontrar cambios en la morfología de la microglía y un perfil proinflamatorio en el grupo Veh+DAG. Además de un perfil anti-inflamatorio en el grupo LPS+DAG. Nos preguntamos si la morfología de microglía podría separarse en 2 grupos, uno proinflamatorio y uno anti-inflamatorio. Por lo que realizamos k-means en busca de dos poblaciones microgliales, encontrando así que en efecto existen dos poblaciones microgliales, la proporción de la población 1 fue de 0.704 mientras que la población 2 fue de 0.295. La separación de poblaciones de microglía se hicieron en función de los 4 grupos debido a que las poblaciones tienden a ser homogéneas por grupo.

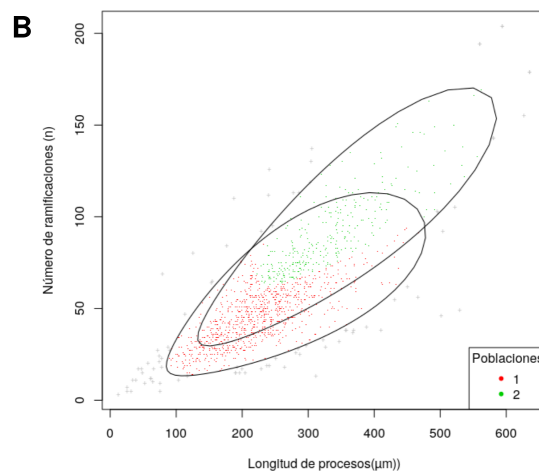
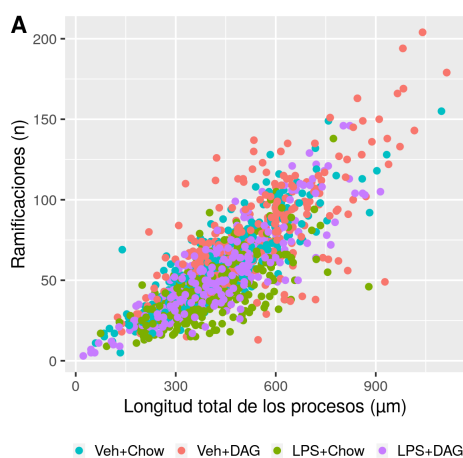


Figura 17: A) Gráfica de densidad de microglía presente en todos los grupos de acuerdo al número de ramificaciones y tamaño de procesos. B) Poblaciones de microglía obtenidas mediante k-means, donde k fue obtenida por BCI.

Poblaciones de microglía en los distintos grupos

Las proporciones encontradas en la relación población 1/ población 2 fueron: 2.9 para Veh+Chow, 1.1 Veh+DAG, 7.3 para Veh+LPS y de 3.5 para LPS+DAG. El grupo Veh+DAG tuvo la mayor proporción de población microglial tipo 2, que se caracteriza por tener una mayor cantidad de ramificaciones y mucho más largas, mientras que los grupos administrados con LPS tienen mayores proporciones de la población 1.

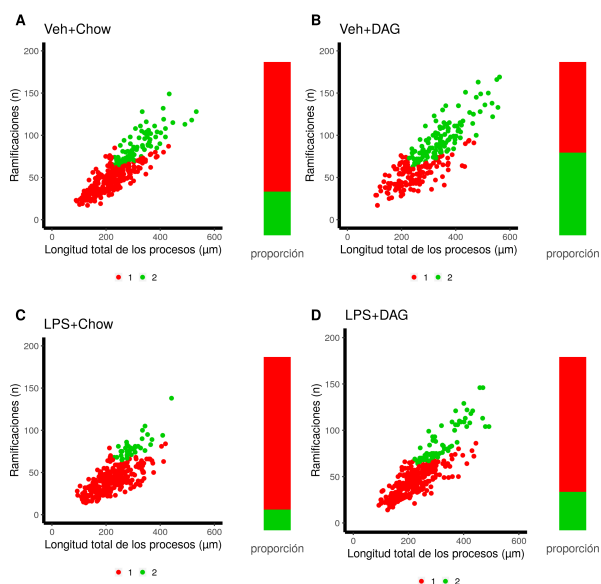


Figura 18: Proporciones de poblaciones microgliales tipo 1 y 2 por cada grupo A) Veh+Chow, B) Veh+DAG, C) LPS+Chow y D) LPS+DAG, la lista fue obtenida mediante k-means.

Las poblaciones de microglía son homogéneas

Dado que se obtuvo que algunos grupos tenían mayor proporción de algún tipo de población de microglía, nos preguntamos

si existía diferencias de diversidad entre los distintos grupos, sin embargo no encontramos diferencias significativas.

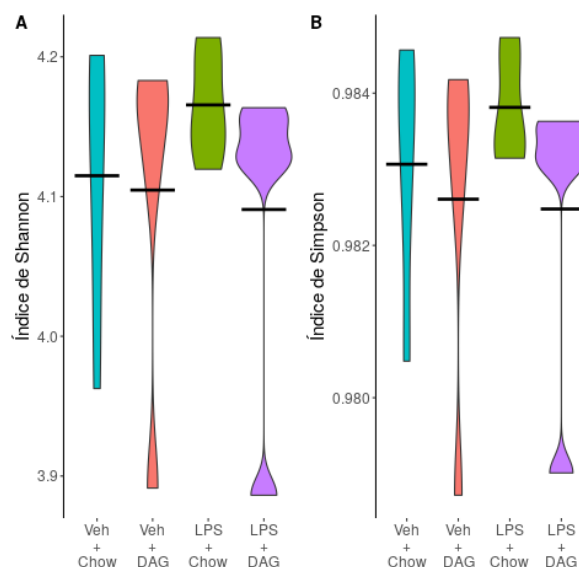


Figura 19: Poblaciones de microglía A) Índice de Shannon B) Índice de Simpson.

Discusión

Las dietas altas en grasa producen cambios metabólicos, inflamación y alteraciones en la conectividad en el hilus del hipocampo dorsal. La microglía juega un papel importante en estas alteraciones [53], ya que tienen receptores de reconocimiento de patrones moleculares, que incluyen el receptor TLR4 y el co-receptor CD14. Estos pueden reconocer patrones asociados a patógenos como LPS y disparar la respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede ser entrenada o tolerante dependiendo del estado previo de la microglía (desensibilizada o sensibilizada) [18]. Durante el desarrollo del cerebro en los primeros días postnatales, la microglía es sensible a cambios a largo plazo que pueden ser atribuidos a una inflamación sistémica. Estos cambios pueden ser permanentes [40] y quizá puedan proteger contra un segundo insulto del ambiente, como la exposición a dietas altas en grasa (DAG) [60,80]. En este estudio, ratones machos fueron expuestos a LPS en el día postnatal 3 y alimentados por una dieta alta en grasa durante 16 semanas después del destete. Con el fin de evaluar si una desensibilización in-

ducida en los primeros días de vida del organismo con LPS; seguido de una inmunotolerancia en el adulto inducida por DAG puede proteger contra un deterioro en la memoria de trabajo, cambios metabólicos e inducir una respuesta anti-inflamatoria. Para nuestro modelo seleccionamos ratones machos debido a que las hembras no son susceptibles a generar memoria de la respuesta inmune innata a edades tempranas con inmunógenos [81]. Se inyectaron el día postnatal 3 con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS el cual se ha reportado [7] que puede inducir memoria del sistema inmune a largo plazo sin afectar el desarrollo de estructuras involucradas en la memoria a corto plazo como hipocampo. Al destete se les proporcionó una dieta alta en grasa (60% kcal provenientes de grasa); edad en que las DAG pueden afectar hipocampo y la memoria de trabajo [52], así como la dieta con el porcentaje de grasa que provoca la mayor ganancia de peso [34]. Nosotros encontramos que aunque LPS+DAG produce un incremento de peso con respecto los controles, incrementan su peso más tardío. Pero no así las concentraciones de glucosa

e insulina, con respecto a los ratones que fueron solo alimentados con una DAG. Tras encontrar que en periferia el LPS previene el incremento de glucosa e insulina, analizamos la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa en hipocampo, una estructura sensible a las DAG [53]. Encontramos que LPS+DAG en el hipocampo provocó un incremento en la expresión de IRS2. Sin embargo en el grupo alimentado solo con DAG no encontramos un incremento en la expresión de genes involucrados con el metabolismo de la glucosa. La siguiente pregunta fue realizar tareas dependientes de hipocampo para evaluar su desempeño. No encontramos diferencias en la construcción de nido en los grupos alimentados con DAG. Por lo que pensamos que el efecto de DAG no fue tan agresivo como para ver un decremento en el desempeño de esta tarea. Por lo que nos preguntamos si el efecto sería visible en una memoria sensible a DAG, como lo es la memoria de trabajo espacial. La cual se ha descrito en la literatura que es afectada por DAG [8, 52, 53]. La DAG repercutió en el desempeño de la memoria espacial de ambos grupos (Veh+DAG y LPS+DAG), como anteriormente se ha reportado. La DAG

perjudicó más al grupo LPS+DAG, los cuales a lo largo de la sesión no tuvieron preferencia por el brazo novedoso. En cambio el grupo Veh+DAG en el primer medio minuto tuvo el desempeño comparado con los controles. Como la memoria de trabajo es altamente dependiente del hilus giro dentado [43] y sensible a DAG con cambios en la morfología de microglía [53]. Nosotros analizamos la morfología de la microglía y encontramos que estas células tuvieron los cambios antes descritos por otros autores [48] por efecto de DAG (Veh+DAG). Pero no así en el grupo LPS+DAG donde no se observaron cambios en la morfología de microglía con respecto los controles, es decir, se indujo una resistencia a cambios en la morfología. Al encontrar cambios en la morfología de la microglía, nos preguntamos si estos iban acompañados de un mayor número de células, como usualmente ocurre en un proceso inflamatorio en periferia. Por lo que estimamos el número de microglías presentes en el hilus del GD. No encontramos un incremento en el número de microglías descrito en otras estructuras [47] lo que contrasta con lo encontrado por otros autores en el hilus del giro dentado [52, 53].

La siguiente pregunta fue evaluar la expresión de genes de citocinas, para determinar el perfil del sistema inmune en hipocampo. Encontramos un incremento en la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α . Mientras que en el grupo LPS+DAG encontramos un incremento de la expresión de genes de citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-4, sin un incremento de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α . Por lo que asumimos como un perfil de inmuno tolerancia a DAG mediado por LPS con base a lo anteriormente reportado por otros autores [60]. Es decir, una inmunotolerancia en el grupo LPS+DAG.

Experimentos en los que se han mutado receptores como TLR4 [40] y co-receptores como CD14 [37] involucrados con el reconocimiento de LPS, se ha observado tolerancia a las DAG así como lo es una resistencia al incremento de glucosa e insulina en periferia [37,40]. Y dado que una disminución en la expresión de receptores TLR4 es característico de inmuno tolerancia [82]. Pensamos que LPS en etapas del desarrollo podría inducir un decremento en la expresión de los genes TLR4 y CD14, así como un decremento de genes pro-inflamatorios, acompañado

de un incremento en la expresión de genes anti-inflamatorios en respuesta a la DAG. Por lo que evaluamos TLR4 y CD14. No encontramos cambios en la expresión de TLR4 y CD14 en el grupo Veh+DAG en comparación con los demás grupos. Por lo que suponemos que la respuesta inmune observada en hipocampo es producto de periferia y no de LPS trasladado a hipocampo [83]. También encontramos un incremento de CD14, IBA1 y TMEM119 en el grupo LPS+DAG lo cual podría ser contradictorio a un perfil característico de una inmunotolerancia. Pero recientemente se ha descrito que el CD14 puede sobre expresarse en la microglía para inducir una respuesta supresora, contrario a lo que se observa en la periferia [84]. La expresión de genes pro-inflamatorios en el grupo Veh+DAG, contrasta con los cambios en la morfología de la microglía observados en este grupo. Como lo es un incremento en el tamaño y número de procesos, característicos de un perfil pro-inflamatorio dado por DAG [48]. Mientras que el grupo LPS+DAG presentó una expresión de genes de citocinas anti-inflamatorias y sin cambios en la morfología de la microglía. Lo que refuerza la propuesta de que el per-

fil encontrado en el grupo LPS+DAG es inmunotolerancia. El perfil pro-inflamatorio y anti-inflamatorio no son excluyentes, por lo que buscamos grupos de microglía en los datos obtenidos de la morfología de la microglía. Encontramos dos poblaciones de microglía, la proporción de la tipo 1 se encontró preferentemente en los grupos inyectados con LPS, mientras la tipo 2 solo en el grupo Veh+DAG; nosotros proponemos que la tipo 2 tiene un fenotipo relacionado con un estado pro-inflamatorio ya que es la que tiene procesos más largos así como una mayor cantidad de estos, morfología que se ha observado anteriormente en ratones alimentados con DAGs [48] y acompañados de un perfil pro-inflamatorio de citocinas [52,53], además los ratones LPS+Chow tienen una mayor proporción de microglía tipo 1 que los demás grupos lo cual contrasta con la expresión de mRNA de IL-10 el cual es anti-inflamatorio y se encuentra elevado con respecto de los grupos inyectados con Veh, lo cual podría indicar una desensibilización (un incremento de IL-10 con una mayor proporción de microglía tipo 1), a diferencia del grupo control Veh+Chow, el cual tiene una proporción mayor de mi-

croglía tipo 2 (pro-inflamatoria). Aunque encontramos inmunotolerancia en el grupo LPS+DAG, se ha reportado que la inmunotolerancia puede provocar protección a deterioros como estres crónica inducida en la juventud [85], deterioro cognitivo inducido por cirugía en el envejecimiento [86] y ansiedad [80]. Sin embargo nosotros no encontramos protección en la memoria de trabajo espacial por el grupo LPS+DAG, incluso su desempeño a lo largo del tiempo fue menor que el grupo Veh+DAG. Esto podría ser explicado por el incremento de IRS2, el cual es superior en LPS+DAG en comparación de los grupos Chow. Ya que se ha encontrado que su sobre expresión es un regulador negativo de la formación de la memoria [87]. Por lo que el aumento de IRS2 en hipocampo en LPS+DAG explicaría en parte el decremento en el desempeño de la memoria de trabajo espacial. Esto podría explicar el porque el desempeño de la memoria de trabajo espacial fue peor en el grupo LPS+DAG que en el Veh+DAG. Esto se puede ver reflejado en el desempeño de la memoria de trabajo, es decir, el grupo LPS+DAG tienen un peor desempeño que los Veh+DAG dado por una mayor expre-

sión de IRS2 activados. Por lo que nosotros hipotetizamos que el incremento observado de IRS2 dado por DAG, podría ir acompañado de un incremento en la activación de esta molécula mediado por la expresión de IL-10. Por lo que la sobre expresión de IRS2 sería favorecida por la respuesta anti-inflamatoria [33]. Recientemente no se ha encontrado una relación entre el consumo de DAG en la mediana edad y un deterioro cognitivo [54, 55]. Aunque otros autores han sugerido que en realidad el consumo de DAG solo puede inducir un deterioro cognitivo si se da en etapas críticas en las cuales hay maduración de circuitos neuronales como la adolescencia [49, 51–53], y no así en la adultez. Nosotros sugerimos que el curso de los efectos inducidos por las DAG puede modificarse en función de la programación que un individuo sufre en su desarrollo, es decir, una sensibilización de la respuesta inmune innata podría exacerbar los efectos observados por las DAG induciendo inmunidad entrenada e incrementando la probabilidad de enfermedades como las neurodegenerativas. Mientras que una desensibilización disminuye evita la respuesta pro-inflamatoria dada por DAG (inmuno tolerancia) disminuyen-

do la probabilidad de enfermedades neurodegenerativas. Lo que quizá podría explicar las discrepancias observadas en varias investigaciones con respecto a las DAG [54, 55], es decir, que si el sistema (tanto en periferia como SNC) posee una desensibilización previa a la exposición de una DAG capaz de inducir inmunotolerancia durante etapas de desarrollo como la adolescencia.

En los experimentos de Hu [34], se observa que la grasa incrementan la ganancia de peso. Pero este incremento de peso no es lineal, al sobrepasar los 60 % de grasa en la dieta, la ganancia de peso ya no es óptima (los ratones alimentados con un porcentaje mayor, como lo es 70 % de grasa en la dieta, ganan menos peso que los alimentados con 60 %). Un efecto parecido se observa con LPS [18, 27], el cual tampoco tiene un efecto lineal. Ya que puede incrementar la concentración de citocinas pro-inflamatorias conforme se incrementa su concentración, hasta que llega a un punto (la dosis depende de la edad y cepa de bacteria) en que el LPS empieza a decrementar la concentración de citocinas pro-inflamatorias e incrementar las de anti-inflamatorias. Es decir pasa de un estado de inmunidad entrenada a uno de in-

muno tolerancia [15]. Lo que quizá apoye la propuesta de Cani [37]. Quien propone que el estado pro-inflamatorio favorece el incremento de peso así como las concentraciones de glucosa e insulina. Ya que al sobrepasar los 60 % de grasa es posible que se llegue a la tolerancia como ocurre con el LPS.

Sin embargo nosotros adicionamos a su propuesta que el estado pro-inflamatorio inducido por las DAG, depende además del estado previo del sistema inmune innato (sensibilizado o desensibilizado). Como se observa en nuestros resultados y otros autores [60], ya que se observa resistencia al incremento de las concentraciones de glucosa e insulina, así como a la expresión de mRNA de citocinas pro-inflamatorias. Es decir, el incremento en la concentración de glucosa e insulina, así como el incremento de citocinas pro-inflamatorias por las DAG ya no es a los 60 % de grasa en ratones cuyo sistema inmune innato fue desensibilizado.

Nosotros proponemos que al inducir una desensibilización, se requerirá más porcentaje de grasa en la dieta para inducir el mismo efecto que en individuos no desensibilizados. Y un menor porcentaje de grasa en la dieta para inducir un incremento de peso. Es decir la curva de ganancia de pe-

so dado por la grasa descrita anteriormente por otros autores [34], la máxima ganancia de peso ya no será a los 60 % de grasa en la dieta en ratones desensibilizados o sensibilizados. Dicha curva se desplazará a la ordenada de la origen en ratones sensibilizados o se alejará en ratones desensibilizados. Por lo que es de esperar que las dietas altas en grasa afecten más a unos individuos que otros, lo que explicaría porque algunos autores encuentran discrepancias con el efecto de las DAG [54, 55].

Aunque no hemos hecho hincapié en los carbohidratos, estos tienen una participación importante en la reprogramación del sistema inmune innato, como lo es la glucosa [15, 16]. Ya que aunque es reconocido que la grasa en la dieta puede inducir una respuesta pro-inflamatoria [37], un perfil pro-inflamatorio requiere de la glucólisis y en ausencia de glucosa no puede montar una respuesta pro-inflamatoria. En cambio una respuesta anti-inflamatoria depende de la β -oxidación [15, 16]. Por lo que además del estado previo de la memoria del sistema inmune innato (sensibilización o desensibilización), también se requiere de cierta cantidad de glucosa para inducir un estado pro-inflamatorio.

Conclusión

Nosotros sugerimos que el consumo de la dieta alta en grasa después de la exposición a LPS induce inmuno tolerancia con la expresión de genes de un perfil anti-inflamatorio en el hipocampo así como la resistencia a un incremento de insulina en suero, glucosa en sangre y a cambios en la morfología de la microglía en el hilus del giro dentado, sin prevención en el deterioro de la memoria de trabajo en ratones machos.

Bibliografía

- [1] Marco Prinz, Takahiro Masuda, Michael A Wheeler, and Francisco J Quintana. Microglia and central nervous system-associated macrophages—from origin to disease modulation. *Annual review of immunology*, 39:251–277, 2021.
- [2] Csaba Cserép, Balázs Pósfa, and Ádám Dénes. Shaping neuronal fate: functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions. *Neuron*, 109(2):222–240, 2021.
- [3] R Bryan Rock and Phillip K Peterson. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(2):117–126, 2006.
- [4] Diego Gomez-Nicola and V Hugh Perry. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *The Neuroscientist*, 21(2):169–184, 2015.
- [5] Maria Nikodemova, Rebecca S Kimyon, Ishani De, Alissa L Small, Lara S Collier, and Jyoti J Watters. Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. *Journal of neuroimmunology*, 278:280–288, 2015.
- [6] Staci Bilbo and Beth Stevens. Microglia: the brain’s first responders. In *Cerebrum: the Dana forum on brain science*, volume 2017. Dana Foundation, 2017.
- [7] Staci D Bilbo and Jaclyn M Schwarz. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 3:14, 2009.
- [8] Marie Anais Labouesse, Wolfgang Langhans, and Urs Meyer. Long-term pathological consequences of prenatal infection: Beyond brain disorders. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Compara-*

-
- tive Physiology*, pages ajpregu-00087, 2015.
- [9] Rodney W Johnson. Feeding the beast: Can microglia in the senescent brain be regulated by diet? *Brain, behavior, and immunity*, 43:1–8, 2015.
- [10] Lauren L Williamson, Paige W Sholar, Rishi S Mistry, Susan H Smith, and Staci D Bilbo. Microglia and memory: modulation by early-life infection. *The Journal of Neuroscience*, 31(43):15511–15521, 2011.
- [11] Christopher L Cunningham, Verónica Martínez-Cerdeño, and Stephen C Noctor. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience*, 33(10):4216–4233, 2013.
- [12] Surya Pandey, Taro Kawai, and Shizuo Akira. Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1):a016246, 2015.
- [13] Taro Kawai and Shizuo Akira. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5):637–650, 2011.
- [14] Hugo González, Daniela Elgueta, Andro Montoya, and Rodrigo Pacheco. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 274(1–2):1 – 13, 2014.
- [15] Michael Bauer, Sebastian Weis, Mihai G Netea, and Reinhard Wetzker. Remembering pathogen dose: long-term adaptation in innate immunity. *Trends in immunology*, 39(6):438–445, 2018.
- [16] Anaisa Valido Ferreira, Jorge Domiguéz-Andrés, and Mihai Gheorghe Netea. The role of cell metabolism in innate immune memory. *Journal of Innate Immunity*, 14(1):42–50, 2022.
- [17] Alex P Salam, Alessandra Borsini, and Patricia A Zunszain. Trained innate immunity: A salient factor in the pathogenesis of neuroimmune psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 23(2):170–176, 2018.
-

-
- [18] Jonas J Neher and Colm Cunningham. Priming microglia for innate immune memory in the brain. *Trends in immunology*, 40(4):358–374, 2019.
- [19] Mihai G Netea, Leo AB Joosten, Eicke Latz, Kingston HG Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G Stunnenberg, Luke AJ O’Neill, and Ramnik J Xavier. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284):aaf1098, 2016.
- [20] Inge R Holtman, Divya D Raj, Jeremy A Miller, Wandert Schaafsma, Zhuoran Yin, Nieske Brouwer, Paul D Wes, Thomas Moller, Marie Orre, Willem Kamphuis, et al. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta neuropathologica communications*, 3(1):1–18, 2015.
- [21] V Hugh Perry and Clive Holmes. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 10(4):217–224, 2014.
- [22] BJL Eggen, D Raj, U-K Hanisch, and HWGM Boddeke. Microglial phenotypic and adaptation. *Journal of Neuro-immune Pharmacology*, 8(4):807–823, 2013.
- [23] In Koo Hwang, Choong Hyun Lee, Hua Li, Ki-Yeon Yoo, Jung Hoon Choi, Dae Won Kim, Dong-Woo Kim, Hong-Won Suh, and Moo-Ho Won. Comparison of ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity of the hippocampal dentate gyrus and ca1 region in adult and aged dogs. *Neurochemical research*, 33(7):1309–1315, 2008.
- [24] Osamu Takeuchi and Shizuo Akira. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6):805–820, 2010.
- [25] Urs Meyer, Myriel Nyffeler, Andrea Engler, Adrian Urwyler, Manfred Schedlowski, Irene Knuesel, Benjamin K Yee, and Joram Feldon. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *The Journal of neuroscience*, 26(18):4752–4762, 2006.
- [26] Charity E Onore, Jared J Schwartzner, Milo Careaga, Robert F Berman, and
-

- Paul Ashwood. Maternal immune activation leads to activated inflammatory macrophages in offspring. *Brain, behavior, and immunity*, 38:220–226, 2014.
- [27] Ann-Christin Wendeln, Karoline Degenhardt, Lalit Kaurani, Michael Gertig, Thomas Ulas, Gaurav Jain, Jessica Wagner, Lisa M Häsler, Katleen Wild, Angelos Skodras, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*, 556(7701):332–338, 2018.
- [28] Yasuo Terauchi, Iseki Takamoto, Naoto Kubota, Junji Matsui, Ryo Suzuki, Kazuro Komeda, Akemi Hara, Yukiyasu Toyoda, Ichitomo Miwa, Shinichi Aizawa, et al. Glucokinase and irs-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 117(1):246–257, 2007.
- [29] Jinghua Peng and Ling He. Irs post-translational modifications in regulating insulin signaling. *Journal of molecular endocrinology*, 60(1):R1–R8, 2018.
- [30] Ling He. Alterations of gut microbiota by overnutrition impact gluconeogenic gene expression and insulin signaling. *International journal of molecular sciences*, 22(4):2121, 2021.
- [31] Jia Cao, Jinghua Peng, Hongying An, Qiyi He, Tatiana Boronina, Shaodong Guo, Morris F White, Philip A Cole, and Ling He. Endotoxemia-mediated activation of acetyltransferase p300 impairs insulin signaling in obesity. *Nature communications*, 8(1):1–12, 2017.
- [32] Nicola M Heller, Xiulan Qi, Ilkka S Junntila, Kari Ann Shirey, Stefanie N Vogel, William E Paul, and Achsah D Keegan. Type i il-4rs selectively activate irs-2 to induce target gene expression in macrophages. *Science signaling*, 1(51):ra17–ra17, 2008.
- [33] Dennys E Cintra, José R Pauli, Eliana P Araújo, Juliana C Moraes, Cláudio T de Souza, Marciane Milanski, Joseane Morari, Alessandra Gambero, Mário J Saad, and Licio A Velloso. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resis-

- tance in liver. *Journal of hepatology*, 48(4):628–637, 2008.
- [34] Sumei Hu, Lu Wang, Dengbao Yang, Li Li, Jacques Togo, Yingga Wu, Quansheng Liu, Baoguo Li, Min Li, Guanlin Wang, et al. Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. *Cell metabolism*, 28(3):415–431, 2018.
- [35] Harris R Lieberman, Victor L Fulgoni III, Sanjiv Agarwal, Stefan M Pasiakos, and Claire E Berryman. Protein intake is more stable than carbohydrate or fat intake across various us demographic groups and international populations. *The American journal of clinical nutrition*, 112(1):180–186, 2020.
- [36] Julia L. Sobesky, Ruth M. Barrientos, Henning S. De May, Brittany M. Thompson, Michael D. Weber, Linda R. Watkins, and Steven F. Maier. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal $il-1\beta$, an effect that can be prevented with dietary reversal or $il-1$ receptor antagonism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42(0):22 – 32, 2014.
- [37] Patrice D Cani, Jacques Amar, Miguel Angel Iglesias, Marjorie Poggi, Claude Knauf, Delphine Bastelica, Audrey M Neyrinck, Francesca Fava, Kieran M Tuohy, Chantal Chabo, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7):1761–1772, 2007.
- [38] NathalieM Delzenne, AudreyM Neyrinck, and PatriceD Cani. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 2011.
- [39] Jessica L. Bolton and Staci D. Bilbo. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16:307–320, 2014.
- [40] Ellen E Jackson, Elisabeth Rendina-Ruedy, Brenda J Smith, and Veronique A Lacombe. Loss of toll-like receptor 4 function partially protects

- against peripheral and cardiac glucose metabolic derangements during a long-term high-fat diet. *PLoS one*, 10(11):e0142077, 2015.
- [41] Elaine Y Hsiao, Sara W McBride, Sophia Hsien, Gil Sharon, Embriette R Hyde, Tyler McCue, Julian A Codelli, Janet Chow, Sarah E Reisman, Joseph F Petrosino, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7):1451–1463, 2013.
- [42] Perrine André, Fabienne Laugerette, and Catherine Féart. Metabolic endotoxemia: a potential underlying mechanism of the relationship between dietary fat intake and risk for cognitive impairments in humans? *Nutrients*, 11(8):1887, 2019.
- [43] Takuya Sasaki, Verónica C Piatti, Ernie Hwaun, Siavash Ahmadi, John E Lisman, Stefan Leutgeb, and Jill K Leutgeb. Dentate network activity is necessary for spatial working memory by supporting ca3 sharp-wave ripple generation and prospective firing of ca3 neurons. *Nature neuroscience*, 21(2):258–269, 2018.
- [44] Shintaro Funahashi. Working memory in the prefrontal cortex. *Brain sciences*, 7(5):49, 2017.
- [45] Ryan A Wirt and James M Hyman. Integrating spatial working memory and remote memory: interactions between the medial prefrontal cortex and hippocampus. *Brain sciences*, 7(4):43, 2017.
- [46] Amy L Griffin. The nucleus reuniens orchestrates prefrontal-hippocampal synchrony during spatial working memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 128:415–420, 2021.
- [47] Caroline Baufeld, Anja Osterloh, Stefan Prokop, Kelly R Miller, and Frank L Heppner. High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of cns resident microglia. *Acta neuropathologica*, 132(3):361–375, 2016.
- [48] Miriam E Bocarsly, Maria Fasolino, Gary A Kane, Elizabeth A LaMarca, Gregory W Kirschen, Ilia N Karatsoreos, Bruce S McEwen, and Elizabeth

- Gould. Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51):15731–15736, 2015.
- [49] Chloe Boitard, Nicole Etchamendy, Julie Sauvant, Agnes Aubert, Sophie Tronel, Aline Marighetto, Sophie Layé, and Guillaume Ferreira. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*, 22(11):2095–2100, 2012.
- [50] Chloé Boitard, Amandine Cavaroc, Julie Sauvant, Agnès Aubert, Nathalie Castanon, Sophie Layé, and Guillaume Ferreira. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain, behavior, and immunity*, 40:9–17, 2014.
- [51] Marie A Labouesse, Olivier Lassalle, Juliet Richetto, Jillian Iafrazi, Ulrike Weber-Stadlbauer, Tina Notter, Tilo Gschwind, Lluís Pujadas, Eduardo Soriano, AC Reichelt, et al. Hypervul-
- nerability of the adolescent prefrontal cortex to nutritional stress via reelin deficiency. *Molecular Psychiatry*, 22(7):961–971, 2017.
- [52] Angeles Vinuesa, Carlos Pomilio, Martin Menafra, Maria Marta Bonaventura, Laura Garay, María Florencia Mercogliano, Roxana Schillaci, Victoria Lux Lantos, Fernando Brites, Juan Beauquis, et al. Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity. *Psychoneuroendocrinology*, 72:22–33, 2016.
- [53] Angeles Vinuesa, Melisa Bentivegna, Gastón Calfa, Fabia Filipello, Carlos Pomilio, María Marta Bonaventura, Victoria Lux-Lantos, María Eugenia Matzkin, Amal Gregosa, Jessica Prensa, et al. Early exposure to a high-fat diet impacts on hippocampal plasticity: implication of microglia-derived exosome-like extracellular vesicles. *Molecular neurobiology*, 56(7):5075–5094, 2019.
- [54] Tasnime N Akbaraly, Archana Singh-Manoux, Aline Dugravot, Eric J Brun-

- ner, Mika Kivimäki, and Séverine Sabia. Association of midlife diet with subsequent risk for dementia. *Jama*, 321(10):957–968, 2019.
- [55] Jennifer L Dearborn-Tomazos, Aozhou Wu, Lyn M Steffen, Cheryl AM Anderson, Emily A Hu, David Knopman, Thomas H Mosley, and Rebecca F Gottesman. Association of dietary patterns in midlife and cognitive function in later life in us adults without dementia. *JAMA network open*, 2(12):e1916641–e1916641, 2019.
- [56] Cristina Palacios, Marcia Magnus, Alejandro Arrieta, Héctor Gallardo, Roberto Tapia, and Carlos Espinal. Obesity in latin america, a scoping review of public health prevention strategies and an overview of their impact on obesity prevention. *Public Health Nutrition*, pages 1–14, 2021.
- [57] Ketevan Rtveladze, Tim Marsh, Simon Barquera, Luz Maria Sanchez Romero, David Levy, Guillermo Melendez, Laura Webber, Fanny Kilpi, Klim McPherson, and Martin Brown. Obesity prevalence in mexico: impact on health and economic burden. *Public health nutrition*, 17(1):233–239, 2014.
- [58] Heather Francis and Richard Stevenson. The longer-term impacts of western diet on human cognition and the brain. *Appetite*, 63:119–128, 2013.
- [59] Felice N Jacka, Nicolas Cherbuin, Kaarin J Anstey, Perminder Sachdev, and Peter Butterworth. Western diet is associated with a smaller hippocampus: a longitudinal investigation. *BMC medicine*, 13(1):1–8, 2015.
- [60] C-F Huang, J-X Du, W Deng, X-C Cheng, S-Y Zhang, S-J Zhao, M-J Tao, G-Z Chen, and X-Q Hao. Effect of prenatal exposure to lps combined with pre-and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. *Neuroscience*, 286:364–370, 2015.
- [61] F Dellu, A Contarino, H Simon, GF Koob, and LH Gold. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiology of learning and memory*, 73(1):31–48, 2000.

-
- [62] Sandra Giovanoli, Tina Notter, Juliet Richetto, Marie A Labouesse, Stéphanie Vuillermot, Marco A Riva, and Urs Meyer. Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *Journal of neuroinflammation*, 12(1):1–18, 2015.
- [63] Robert MJ Deacon. Assessing nest building in mice. *Nature protocols*, 1(3):1117–1119, 2006.
- [64] Brianna N Gaskill, Alicia Z Karas, Joseph P Garner, and Kathleen R Pritchett-Corning. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 1(82):e51012, 2013.
- [65] David R Matthews, JP Hosker, AS Rudenski, BA Naylor, DF Treacher, and RC Turner. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7):412–419, 1985.
- [66] MH Duncan. A simple measure of insulin resistance. *Lancet*, 346:120–121, 1995.
- [67] E Zambrano, CJ Bautista, M Deas, PM Martinez-Samayoa, M Gonzalez-Zamorano, H Ledesma, J Morales, F Larrea, and PW Nathanielsz. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *The Journal of physiology*, 571(1):221–230, 2006.
- [68] Abraham Rosas-Arellano, Juan B Villalobos-González, Lourdes Palma-Tirado, Felipe A Beltrán, Alfonso Cárabez-Trejo, Fanis Missirlis, and Maite A Castro. A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochemistry and cell biology*, 146(4):421–430, 2016.
- [69] Kenneth J Livak and Thomas D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method. *methods*, 25(4):402–408, 2001.
- [70] Stephan Preibisch, Stephan Saalfeld, and Pavel Tomancak. Globally op-
-

- timal stitching of tiled 3d microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 25(11):1463–1465, 2009.
- [71] Chi Wang Ip, David Cheong, and Jens Volkman. Stereological estimation of dopaminergic neuron number in the mouse substantia nigra using the optical fractionator and standard microscopy equipment. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 1(127):e56103, 2017.
- [72] Mark J West. Getting started in stereology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(4):pdb-top071845, 2013.
- [73] Mohammad Hosseini-Sharifabad and Jens Randel Nyengaard. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *Journal of neuroscience methods*, 162(1-2):206–214, 2007.
- [74] Anna Kreutz and Nicole Barger. Maximizing explanatory power in stereological data collection: A protocol for reliably integrating optical fractionator and multiple immunofluorescence techniques. *Frontiers in Neuroanatomy*, page 73, 2018.
- [75] Piotr Stepień, Wojciech Krauze, and Małgorzata Kujawińska. Preprocessing methods for quantitative phase image stitching. *Biomedical Optics Express*, 13(1):1–13, 2022.
- [76] Veerle Paternoster, Anto P Rajkumar, Jens Randel Nyengaard, Anders Dupont Børglum, Jakob Grove, and Jane Hvarregaard Christensen. The importance of data structure in statistical analysis of dendritic spine morphology. *Journal of Neuroscience Methods*, 296:93–98, 2018.
- [77] Helena Morrison, Kimberly Young, Mahir Qureshi, Rachel K Rowe, and Jonathan Lifshitz. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific reports*, 7(1):1–12, 2017.
- [78] Kimberly Young and Helena Morrison. Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 1(136):e57648, 2018.

- [79] Kenneth Lo, Florian Hahne, Ryan R Brinkman, and Raphael Gottardo. flowclust: a bioconductor package for automated gating of flow cytometry data. *BMC bioinformatics*, 10(1):1–8, 2009.
- [80] Arthur Rocha-Gomes, Amanda Escobar Teixeira, Dalila Gomes de Oliveira, Camilla Mainy Oliveira Santiago, Alexandre Alves da Silva, Tania Regina Riul, Ana Cristina Rodrigues Lacerda, Vanessa Amaral Mendonça, Etel Rocha-Vieira, and Hércules Ribeiro Leite. Lps tolerance prevents anxiety-like behavior and amygdala inflammation of high-fat-fed dams’ adolescent offspring. *Behavioural Brain Research*, 411:113371, 2021.
- [81] Amy E Braun, Pamela A Carpentier, Brooke A Babineau, Aditi R Narayan, Michelle L Kielhold, Hyang Mi Moon, Archana Shankar, Jennifer Su, Vidya Saravanapandian, Ursula Haditsch, et al. “females are not just ‘protected’ males”: Sex-specific vulnerabilities in placenta and brain after prenatal immune disruption. *eneuro*, 6(6), 2019.
- [82] Dan Liu, Shousong Cao, Yejiang Zhou, and Yuxia Xiong. Recent advances in endotoxin tolerance. *Journal of cellular biochemistry*, 120(1):56–70, 2019.
- [83] Alejandra Vargas-Caraveo, Aline Sayd, Sandra R Maus, Javier R Caso, José LM Madrigal, Borja García-Bueno, and Juan C Leza. Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Scientific reports*, 7(1):1–15, 2017.
- [84] Zhenghao Wu, Zhenxiong Zhang, Zehua Lei, and Ping Lei. Cd14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 48:24–31, 2019.
- [85] Yue Gu, Ting Ye, Pingping Tan, Lijuan Tong, Jianlin Ji, Yiming Gu, Zhongxia Shen, Xinhua Shen, Xu Lu, and Chao Huang. Tolerance-inducing effect and properties of innate immune stimulation on chronic stress-induced behavioral abnormalities in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 91:451–471, 2021.
- [86] Zhijie Zhang, Muhuo Ji, Yanlin Liao, Jianjun Yang, and Jun Gao. Endotoxin

tolerance induced by lipopolysaccharide preconditioning protects against surgery-induced cognitive impairment in aging mice. *Molecular medicine reports*, 17(3):3845–3852, 2018.

[87] Elaine E Irvine, Laura Drinkwater, Kasia Radwanska, Hind Al-Qassab,

Mark A Smith, Melissa O’Brien, Catherine Kielar, Agharul I Choudhury, Stefan Krauss, Jonathan D Cooper, et al. Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation. *Learning & memory*, 18(6):375–383, 2011.

Anexos

Pesos con n incrementada

A continuación se presenta el peso de los ratones que no estuvieron a tiempo para la publicación de l artículo. Hubo un incremento estimado de $0.73 \pm 0.32g$ ($\chi^2(5)=38.1$, $p=0.000000003$) por semana dado por la DAG, y un decremento dado por la interacción de LPS con DAG estimado de $-65 \pm 0.44g$ ($\chi^2(2) = 5,9$, $p=0.05$)

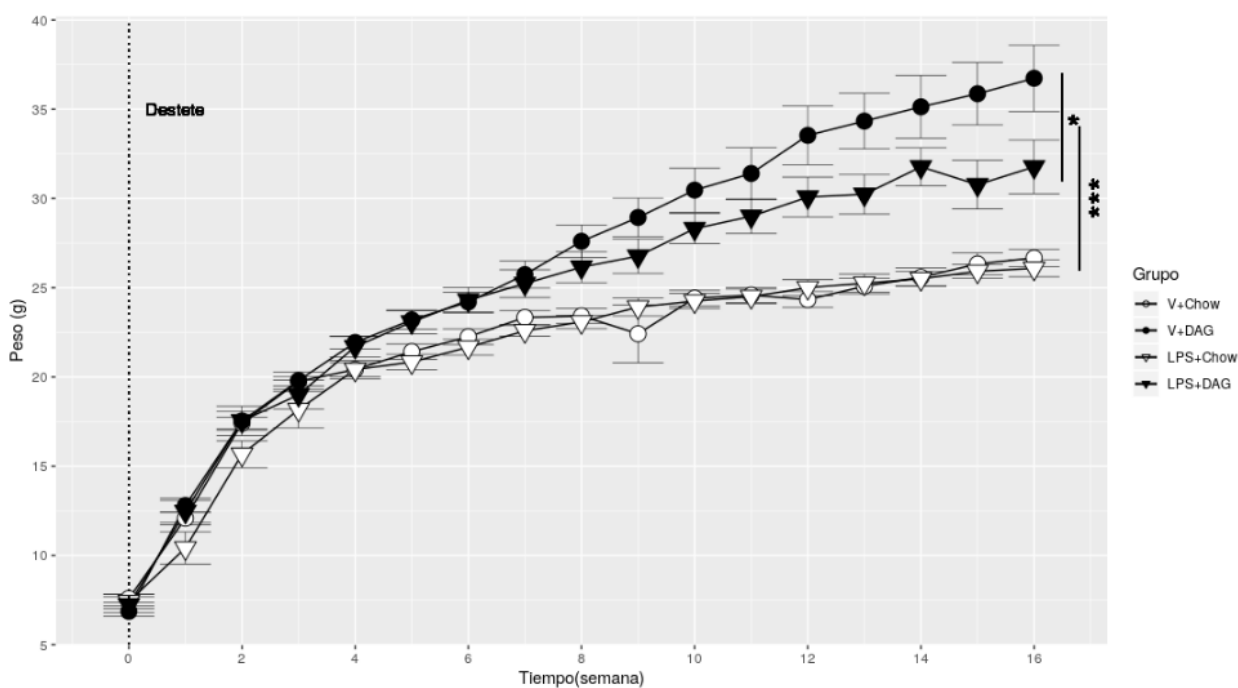


Figura 20: Peso a lo largo de 16 semanas desde el destete de los grupos V+Chow (n=12), V+DAG (n=15), LPS+Chow (n=12) y LPS+DAG(n=13). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$, se analizó mediante modelos mixtos por razón de verosimilitud.

Efecto de la respuesta inmune maternal por inmunógenos en la ganancia de peso de las crías

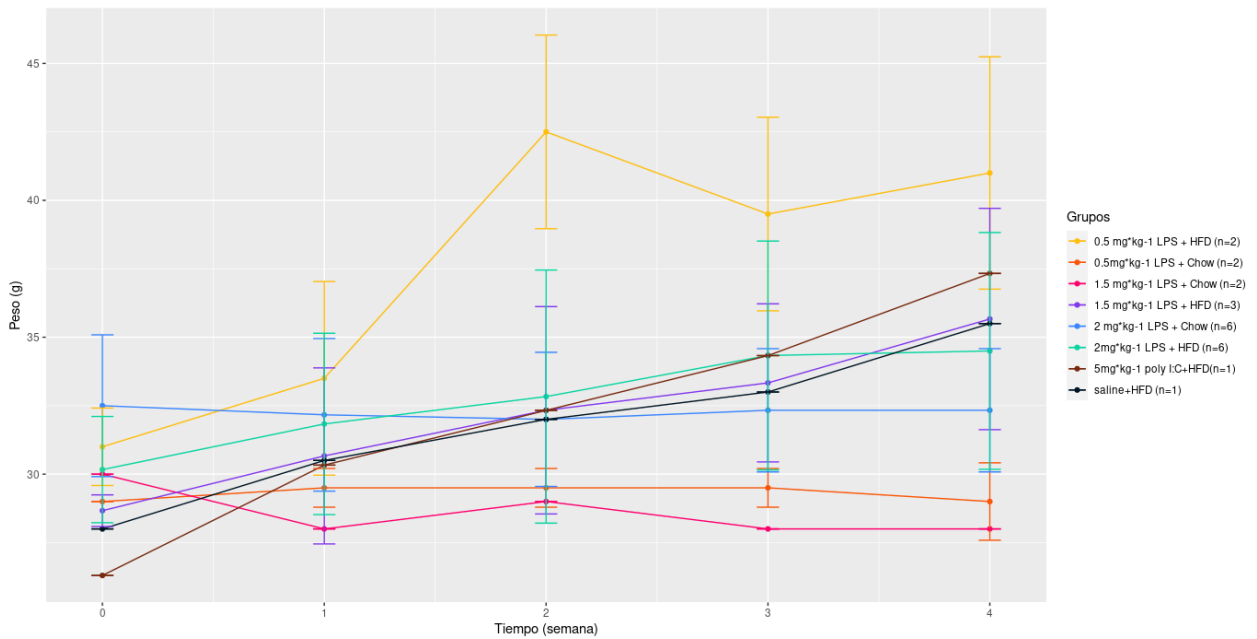


Figura 21: Efecto de la respuesta inmune maternal a inmunógenos en la ganancia de peso a dietas altas en grasa o chow

Efecto de la respuesta inmune maternal a distintas dosis de LPS en la ganancia de peso por dietas altas en grasa en sus crías

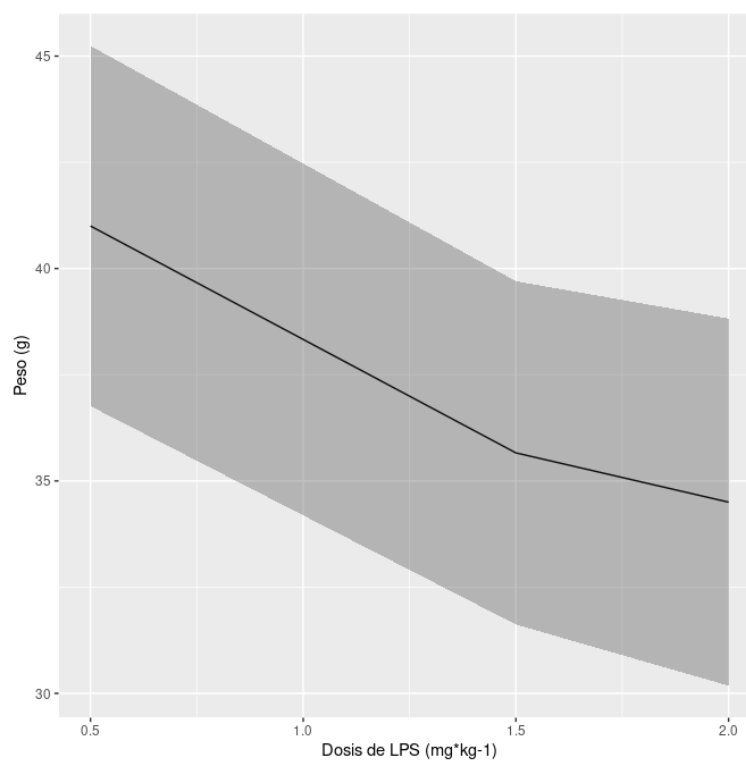
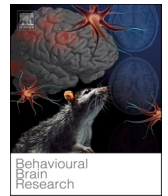


Figura 22: A ratones hembra en día gestacional 17 se les inyectó la dosis de LPS representadas en la imagen. Los críos machos a los 6 meses de edad (mediana edad en el ratón) se les alimento con una dieta alta en grasa de 60 % kcal. Como se observa en la gráfica, a mayor concentración de LPS administrada a la madre menor ganancia de peso



Short Communication

Postnatal exposure to lipopolysaccharide combined with high-fat diet consumption induces immune tolerance without prevention in spatial working memory impairment

Isaac Vargas-Rodríguez^a, Luis Antonio Reyes-Castro^b, Gustavo Pacheco-López^c, Consuelo Lomas-Soria^{b,d}, Elena Zambrano^b, Araceli Díaz-Ruíz^e, Sofía Diaz-Cintra^{a,*}

^a Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología. Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro CP 76230, Mexico

^b Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, 14080, Mexico

^c División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Estado de Mexico CP 52005, Mexico

^d CONACYT-Cátedras, Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, 14080, Mexico

^e Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez S.S.A, Mexico C P 14269, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Microglia
High-fat diet
Lipopolysaccharide
Tolerance
Working memory
Hippocampus
Innate immune memory
Cytokines

ABSTRACT

High-fat diet (HFD) consumption has been related to metabolic alterations, such as obesity and cardiovascular problems, and has pronounced effects on brain plasticity and memory impairment. HFD exposure has a pro-inflammatory effect associated with microglial cell modifications in the hippocampus, a region involved in the working memory process. Immune tolerance can protect from inflammation in periphery induced by HFD consumption, when the immune response is desensitized in development period with lipopolysaccharide (LPS) exposure, maybe this previously state can change the course of the diseases associated to HFDs but is not known if can protect the hippocampus's inflammatory response. In the present study, male mice were injected with LPS (100 µg.kg⁻¹ body weight) on postnatal day 3 and fed with HFD for 16 weeks after weaning. Ours results indicated that postnatal exposure to LPS in the early postnatal developmental stage combined with HFD consumption prevented glycemia, insulin, HOMA-IR, microglial process, and increased pro-inflammatory cytokines mRNA expression, without changes in body weight gain and spatial working memory with respect vehicle + HFD group. These findings suggest that HFD consumption after postnatal LPS exposure induces hippocampal immune tolerance, without prevention in spatial working memory impairment on male mice.

1. Introduction

High-fat diets (HFDs) impair “hippocampal-dependent memory”. However, HFD consumption in adulthood produces fewer adverse neurocognitive outcomes than at an infant-juvenile age [1], near weaning [2,3]. Animal studies have shown that HFD consumption in early stages alters hippocampal function by impairing spatial working memory [3]. This impairment can be attributed to synaptic pruning by microglia [1] and is associated with changes in microglial morphology [4]. Spatial working memory is dependent on the function of the hippocampus, but part of there is the dorsal dentate gyrus, which with an HFD sensitive structure with a pro-inflammatory profile in the hilus as well as microglial morphological changes [5].

Additionally, HFD can produce metabolic endotoxemia with

concomitant increased lipopolysaccharides (LPS) concentrations in plasma [6]. Metabolic endotoxemia is high-fat dietary content dependent and a possible risk factor for developing cognitive impairment. It can also cause chronic peripheral inflammation [7]. Peripheral inflammation insults can exacerbate microglial inflammatory responses if these cells are primed [8]. Microglia can be primed with an immunogen during the developmental stage and unmasked later in life, producing an exacerbated immune response [9], with this response being dose dependent. Low doses of LPS in the periphery can elicit a pro-inflammatory response in the brain along with an augmentation of cytokines without changes in the microglial process length, but consecutive low doses of LPS induce tolerance characterized by pro-inflammatory cytokines reduction [10]. This immune tolerance phenomenon can be generated in the developmental stages, providing

* Corresponding author.

E-mail address: yoldi@unam.mx (S. Diaz-Cintra).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113776>

Received 7 October 2021; Received in revised form 21 January 2022; Accepted 30 January 2022

Available online 2 February 2022

0166-4328/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

protection to HFDs and lowering pro-inflammatory cytokines in periphery [11] and amygdala [12]. Therefore, we hypothesize that exposure to LPS in developmental windows combined with HFD consumption induces hippocampal immune tolerance and spatial working memory impairment on male mice.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

All animal protocols used in this study complied with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Care and Use Committee of the Institute of Neurobiology at Universidad Nacional Autónoma de México (License No. 057). C57BL/6 mice were individually caged with water and food ad libitum and kept in a room with 12 h of artificial light beginning at 7:00 h. The room temperature was 23 ± 1 °C. Males at postnatal (P) day 3 (P3), taken from different litters (5–6 pups per litter), were used, and injected subcutaneously with 9% NaCl solution as vehicle (V) or $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of LPS (*Escherichia coli* 0127: B8 from SIGMA). On day P21, the pups were weaned and changed to an inverted cycle room where they were fed a high-fat diet (HFD, Research Diets D12492 with 60% Kcal derived from fat) or control diet (Laboratory Rodent Diet, Chow; 5001, Purina 13.5% derived from fat). Food and water were available ad libitum. The mice were divided into four groups: V+Chow ($n = 11$); V+HFD ($n = 11$); LPS+Chow ($n = 11$); and LPS+HFD ($n = 11$). All groups were kept on their respective diets after weaning throughout the study. The animals were weighed at weaning and weekly thereafter until adulthood at 16 weeks.

The animals were maintained on a reverse 12 light/dark cycle (lights off from 8 am until 8 pm). The Y maze task (spatial working memory) was evaluated at post-natal week 16 (between 09:00 h and 14:00 h). At the end of the behavioral assessment (post-natal week 17), the food was withdrawn 4 h before anesthetized for intravenous puncture to assess the blood glucose concentration and insulin was determined by ELISA (EZRMI-13 K Sigma-Aldrich), homeostasis model assessment (HOMA) was calculated from $\text{HOMA} = \text{glucose}(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}) \cdot \text{insulin}(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}) / 22.5$ [13]. After, the animals were euthanized (P140), five mice per group were perfused to obtain the brain for histological analysis and six mice per group were dissected for gene expression analysis in hippocampus.

2.1.1. Behavior task (Y-shaped maze)

The test was conducted in a clear acrylic Y-maze inside a room with a white light at 30 lux intensity and walls covered with spatial keys. In phase 1, one arm was kept closed (novel arm). The mouse was placed in a random arm (start arm) and allowed to explore the other arm (known arm) for 5 min. After that, the mouse was removed from the maze and placed in its cage for 15 min. The maze was cleaned with alcohol (70%) and the sawdust was replaced. In phase 2, the mouse was allowed to explore the three arms for 120 s. Each mouse had a different starting position and novel arm. We evaluated the time spent (%) in the novel arm. The animal behavior was recorded and analyzed with Smart 2.0 software.

2.1.2. Tissue collection

Five animals from each group were euthanized with Pentobarbital ($125 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (7.4 pH). The brains were removed from the skull and left for 24 h in this solution at 4 °C and then transferred to a cryoprotectant solution of 30% sucrose. After three days, the brains were frozen in a cryostat to obtain serial sagittal sections that were trimmed at a thickness of $40 \mu\text{m}$ following the coordinates 0.48–2.16 mm lateral to bregma [14]. All sections including the dorsal hippocampus were analyzed at $240 \mu\text{m}$ of separation.

2.2. Immunohistochemistry assay

After unmasking epitopes with citrate buffer pH = 6 at 90 °C for 20 min, we incubated tissues with 3% H_2O_2 in saline phosphate buffer with 1% Triton X-100 and 5% Tween 20 for 30 min. Tissues were subsequently incubated with Iba1 (PA5–18488 Invitrogen) at $1 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1:500 dilution) with Antibody Signal Enhancer [15], then incubated overnight at 4 °C with the A + B system and revealed with the glucose oxidase reaction with diamine benzidine solution.

2.3. Morphometric analysis

2.3.1. Estimated cells in the hilus of the dentate gyrus and microglia from immunohistochemistry

From each Nissl-stained hippocampus, 7 sections were analyzed with a separation of $240 \mu\text{m}$ between each one. A Nikon Eclipse Ci microscope (40x NA = 0.65 Plan objective) was used to observe sections on different focal planes and fields to include the entire hilus area of the dentate gyrus. The images were captured using NIS-Element's software and overlapped with the stitching plugin [16] in ImageJ (1.52p version) to reconstruct the 7 virtual sections of the entire hilus of the dentate gyrus of the dorsal hippocampus. For the cell count, the macro from Ip was used with some modifications [17] in the code to include the equation in [18] to calculate grid size ($64 \times 64 \mu\text{m}$) and optical dissector size ($40 \times 40 \mu\text{m}$). The number of cells was estimated considering the thickness of the cut as the height of the optical dissector.

2.3.2. Microglia analysis

Ten well-impregnated and differentiated microglial cells were randomly taken per hilus section of the photomicrographs of the dentate gyrus hilus (70 microglial cells per mouse). Microglial morphology was analyzed with ImageJ's AnalyzeSkeleton plugins following the protocol from [19].

2.3.3. Analysis of reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Six animals from each group were anesthetized and euthanized to dissect the fresh hippocampus. Gene expression was studied by extracting the total RNA from hippocampus using 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogen™) and the number of independent replicates. The amount and quality of RNA were estimated spectrophotometrically at 260/280 nm and a constant amount of RNA (1–3 μg) was reverse transcribed using a reverse transcription assay (Roche Diagnostics). Identical qPCR conditions were utilized for all genes, which were normalized against the housekeeping gene Rpl32 as internal control. The list of primer sequences used in qPCR are presented in supplementary 1. Amplifications were performed on a Light Cycler 2.0 real-time qPCR instrument (Roche) using the Roche master mix in combination with hydrolysis probes (Universal Probe Library; Roche) following a standard protocol. Briefly, activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation was performed at 95 °C for 10 min, followed by 45 amplification cycles consisting of 10 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 1 s at 72 °C. Data obtained from qPCR were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [20].

2.4. Statistical analysis

All data are expressed as Mean \pm SEM from groups. To assess differences between treatment (vehicle and LPS) and diet (Chow and High-fat diet), data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA). $p \leq 0.05$ for the analysis of glucose, insulin, HOMA-IR, gene expression, estimated cell and microglia number with the car library of R 3.6.3, "lawstat" for the "levene" test (homoscedasticity) and the core base libraries for Shapiro (normality), the not normal data from the insulin and HOMA-IR were transformed to log scale to performance two-way ANOVA.

Microglial morphology analysis was performed with nested linear

mixed model using “lmerTest” library, where 3 levels were considered: microglia as level 0, the section from which microglia was obtained as level 1, and the mouse as level 2 [21]. For body weights (with two slope coefficients) and the behavioral task (Y maze), linear mixed models were also used; the p-values of the fixed effects were calculated using ANOVA with Satterthwaite’s method. For ANOVA and mixed models, the groups were compared with the emmeans library using HSD Tukey as a post hoc test.

3. Results

3.1. A high-fat diet induces weight gain and spatial working memory impairment

Mice were fed with HFD for 16 weeks and weight gain was observed as the diet’s effect over time ($F_{1,44} = 4.54$, $p = 0.03$). No statistical differences were observed in the main effect of treatment ($F_{1,44} = 2.68$, $p = 0.14$); as expected, HFD exposure induces weight gain, but V+HFD group gain weight (at week 4) before than LPS+HFD (at week 7) with respect Chow fed groups (V+Chow and LPS+Chow) Fig. 1 A.

Here we measured working memory performance with the Y-maze task. We observed a significant difference over time with treatment ($F_{1,44} = 5.22$, $p = 0.02$) and an interaction between LPS treatment and diet ($F_{1,44} = 5.7$, $p = 0.02$), as well as diet-induced spatial working memory impairment ($F_{1,44} = 10.26$, $p = 0.002$) without changes in the diet for novel arm preference over time ($F_{1,44} = 1.73$, $p = 0.19$), as shown in Fig. 1B.

At 30, 60 and 90 s, we observed that LPS+HFD mice spent less time in the novel arm in comparison to V+Chow and LPS+Chow mice, however at 120 s the V+HFD group was different to Chow fed groups (V+Chow and LPS+Chow).

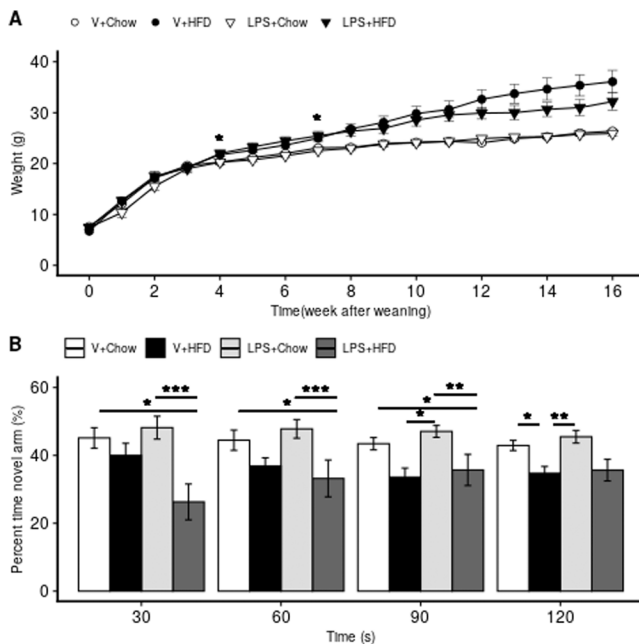


Fig. 1. - A) Mice weight gain during 16 weeks of feeding with HFD or Chow. Data are expressed as Mean±SEM per week after weaning on postnatal day 21. Saline solution + commercial diet (V+Chow) $n = 11$; Saline solution + high-fat diet (V+HFD) $n = 11$; lipopolysaccharide + commercial diet (LPS+Chow) $n = 11$ and lipopolysaccharide and high-fat diet (LPS+HFD) $n = 11$. Mixed model followed by Tukey’s test. B) Mice percentage (%) of time spent in the novel arm in the Y maze after 16 weeks of feeding with HFD or Chow. Data are expressed as Mean±SEM; V+Chow ($n = 11$); V+HFD ($n = 11$); LPS+Chow ($n = 11$) and LPS+HFD ($n = 11$). * $P < 0.05$. Two-way ANOVA followed by Tukey’s test.

Regarding distance traveled in the maze, there was a difference over time given by the interaction LPS treatment with diet exposure ($F_{1,44} = 4.63$, $p = 0.03$). The distance traveled in V+HFD group was more than the others group (V+Chow, LPS+Chow and LPS+HFD).

3.2. Postnatal exposure to LPS prevent blood, insulin, and HOMA-IR glucose increase

As expected, the diet caused a significant difference in blood glucose concentration ($F_{1,32} = 15.94$, $p = 0.0003$), serum insulin concentration ($F_{1,32} = 28.18$, $p = 0.000008$) and HOMA-IR ($F_{1,32} = 28.2$, $p = 0.000008$), but LPS treatment ($F_{1,32} = 0.24$, $p = 0.62$) or the variables interaction ($F_{1,32} = 2.95$, $p = 0.09$) did not cause a statistical difference in glycemia, but LPS cause statistical differences in insulin ($F_{1,32} = 11.3$, $p = 0.002$) and HOMA-IR ($F_{1,32} = 4.47$, $p = .004$), as well as the interaction treatment and diet in insulin ($F_{1,32} = 7.11$, $p = 0.01$) and HOMA-IR ($F_{1,32} = 4.97$, $p = .003$). V+HFD group was different from all experimental groups (V+Chow, LPS+Chow and LPS+HFD) as observed in Figs. 2A, 2B and 2C. Then were measured glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glucokinase (GCK), protein kinase C (PKC) and Insulin receptor substrate 2 (IRS2) in hippocampus, but only G6PDH had a statistical significance given by the treatment ($F_{1,20} = 6.98$, $p = 0.01$) and IRS2 in diet effect ($F_{1,20} = 4.86$, $p = 0.03$).

3.3. LPS exposure and HFD feeding caused resistance to morphological changes in microglia

We estimated the number of microglia in the hilus from V+Chow (1650 ± 133), V+HFD (1742 ± 85), LPS+Chow (1653 ± 124) and LPS+HFD (1545 ± 86). We did not find any difference in the number of microglia given by diet ($F_{1,16} = .355$, $p = 0.5597$) or an interaction treatment-diet ($F_{1,16} = .833$, $p = 0.3749$), as shown in Figure 5B. Diet exerted changes in the total length of processes ($F_{1,20} = 9.54$, $p = 0.005$) and number of branches ($F_{1,20} = 13.77$, $p = 0.001$) but not in endpoints ($F_{1,20} = 1$, $p = 0.3$) as shown in Figs. 3D, 3E and 3C.

LPS treatment induced a significant difference in total process length ($F_{1,20} = 9.54$, $p = 0.005$), branches ($F_{1,20} = 13.77$, $p = 0.001$) and number of end-points ($F_{1,20} = 4.43$, $p = 0.04$); however, the interaction of treatment-diet only caused changes in the total length of microglial processes ($F_{1,20} = 6.03$, $p = 0.02$), without changes in branches ($F_{1,20} = 2.58$, $p = 0.1$) or end-point numbers ($F_{1,20} = .21$, $p = 0.64$).

We observed that the total process length (Fig. 3D) and number of branches per cell (Fig. 3E) were higher in the V+HFD group in comparison to chow fed group (V+Chow), but a protection in morphological changes exerted by HFD was observed given by LPS post-natal exposure (LPS+HFD).

3.4. Increased pro-inflammatory cytokines mRNA expression induced by HFDs is down regulated by post-natal LPS exposure

The resistance to morphological changes observed in microglia from mice exposure to LPS in post-natal age and fed with HFD (LPS+HFD) can be a characteristic from immune tolerance, for this reason we measure gene expression in the hippocampus to find an immune tolerance profile. TNF- α ($F_{1,23} = 4.49$, $p = 0.01$), IL-1 β ($F_{1,23} = 3.34$, $p = 0.04$) and IL-6 ($F_{1,23} = .81$, $p = 0.5$) as pro-inflammatory profile, IL-4 ($F_{1,23} = 2.75$, $p = 0.07$), (F_{1,23} = 8.11, $p = 0.001$) and NRF2 ($F_{1,23} = 2.24$, $p = 0.07$) as anti-inflammatory profile, TLR4 ($F_{1,23} = .62$, $p = 0.6$) and CD14 ($F_{1,23} = 13.35$, $p = 0.001$) the principal receptor and co-receptor for LPS recognition, Iba1 ($F_{1,23} = 6.12$, $p = 0.004$) and TMEM119 ($F_{1,23} = 7.29$, $p = 0.002$) as principal microglial markers. The LPS+HFD group has increased IL-10, CD14, TMEM119 and Iba1 gene expression (anti-inflammatory profile Fig. 4C, Co-receptor to LPS Fig. 4B and microglia markers Fig. 4D) in comparison with V+HFD, which shown an increased TNF- α and IL-1 β gene

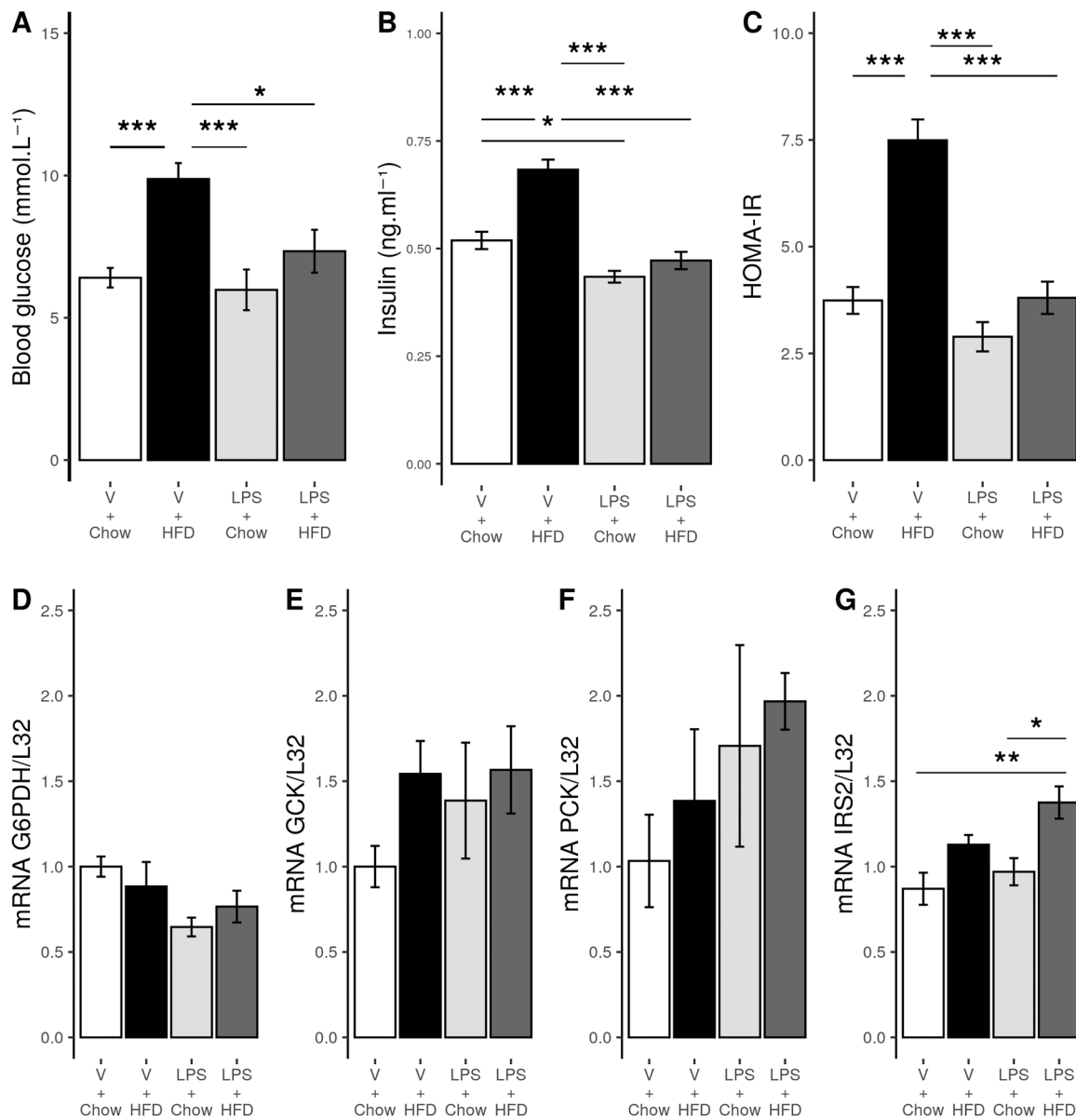


Fig. 2. - A) Mice blood glucose levels, B) serum insulin and C) HOMA-IR after 16 weeks of feeding with HFD or Chow. Data are expressed as Mean \pm SEM; Groups V+Chow (n = 9); V+HFD (n = 9); LPS+Chow (n = 9) and LPS+HFD (n = 9). Hippocampal, mRNA gene expression D) G6PDH, E) GCK, F) PCK and G) IRS2. Groups V+Chow (n = 6); V+HFD (n = 6); LPS+Chow (n = 6) and LPS+HFD (n = 6). * p < 0.05, *** P < .0001; Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

expression (pro-inflammatory Fig. 4A). The anti-inflammatory profile given by HFD in LPS+HFD group is an immune tolerance characteristic.

4. Discussion

HFD consumption from weaning to adulthood produces metabolic, inflammatory and brain connectivity alterations that make the hilus of the hippocampus vulnerable. Microglial cells play an important role in these alterations [5], as they have pattern recognition receptors, including TLR4 and the CD14 co-receptor, which can recognize pathogen-associated molecular patterns like LPS and trigger an immune response. This response can either be trained or tolerant depending on the previous state of the microglia (i.e., primed or desensitized) [8].

During brain development (early postnatal days), microglial cells are sensitive to long-term changes that can be attributed to systemic inflammation. Those changes can be permanent [9] and may protect against a second environmental insult, like exposure to an HFD [11,12], but little has been explored on this matter. In the present study, mice

were exposed to LPS on postnatal day 3 and fed with HFD for 16 weeks after weaning to evaluate if LPS can protect against spatial working memory impairment and microglial changes exerted by HFD.

We observed that post-natal exposure to LPS combined with HFD consumption causes increased weight gain in comparison to Chow-fed groups. Regarding blood glucose, insulin, and HOMA-IR concentration, we showed that LPS+HFD condition prevented the increase of this levels observed in mice V+HFD in the periphery, but in hippocampus IRS2 have an increase level in LPS+HFD, maybe in hippocampus there is not protection as was found in periphery given by LPS in postnatal stage. These results could be associated with changes in the immune response co-receptor and/or receptors, as has been observed in other experiments where resistance to the increase of glucose in blood was found in CD14 [6] and TLR4 [22] mutant mice fed with HFD. The expression of TLR4 and other proteins from the pathway is characteristic of tolerant cells [23]. We think that tolerance induction by LPS early post-natal exposure has a similar response to that of TLR4 and CD14 mutant mice, for this reason we measured TLR4 and CD14 mRNA expression in hippocampus

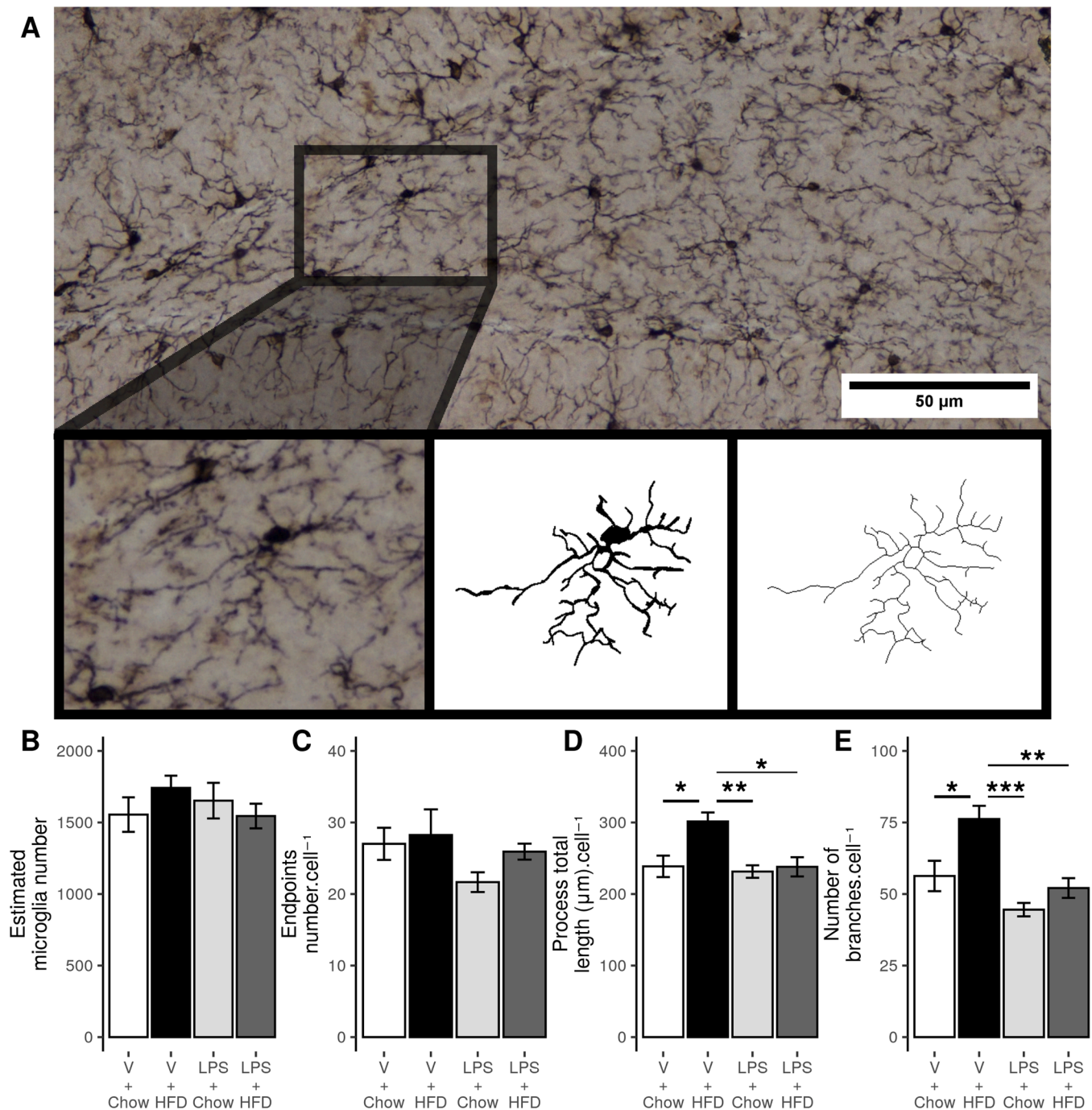


Fig. 3. - A) Representative photomicrograph showing immunohistochemistry with Iba1 as a microglial marker and pairwise in ImageJ. Seventy microglia per mouse were binarized, skeletonized, and analyzed in ImageJ, and the box shows the magnified image. B) Estimated number of microglia in the hilus of the dentate gyrus. C) Number of endpoint processes. D) Total process length and E) the number of branches per cell. Data are expressed as Mean±SEM; V+ Chow (n = 5), V+HFD, (n = 5); LPS+Chow, (n = 5) and LPS+HFD (n = 5). * p < 0.05, ** p < [0.01, ** p < 0.001. Two-way ANOVA followed by Tukey's test for estimated number and multi-level mixed model followed by Tukey's test.

as well as pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines gene expression.

We observed an increased expression in the pro-inflammatory cytokines: as TNF- α and IL-1 β , without changes in TLR4 and CD14 in comparison to V+HFD group. Interestingly, in mice exposed to LPS before than HFD consumption, we found an opposite profile, were the CD14, Iba1, TMEM119 and IL-10 shown an increased expression without changes in TNF- α and IL-1 β in comparison to V+HFD. We consider that this phenotype could be related to tolerance induction by the LPS [10, 11] and the group LPS+C with a IL-10 increase, related to desensitized

phenotype. Despite CD14 was increased with respect all groups, it may seem a pro-inflammatory profile, however in microglia CD14 can enhance or suppress a pro-inflammatory response [24]. In the present study, CD14 could have a suppressive effect because we observed an increased IL-10 expression, without pro-inflammatory profile increases as we observed in the V+HFD. The tolerance phenotype shown in hippocampus could be related to blood glucose increase resistance, as were observed in TLR4 and CD14 mutant mice [6,22], further studies need to explore the mechanistic process. In addition to assessing the effect of increase on the body weight and glycemia increase of mice, we analyzed

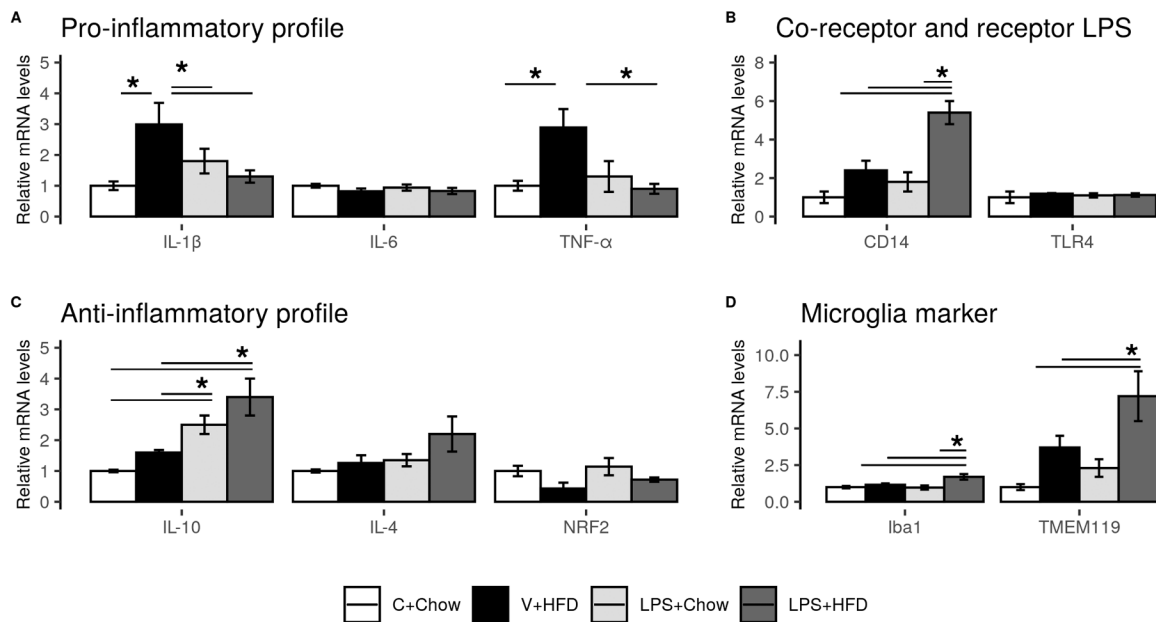


Fig. 4. - Hippocampal mRNA gene expression. Data are expressed as Mean \pm SEM; V+Chow (n = 6), V+HFD, (n = 6); LPS+Chow, (n = 6) and LPS+HFD (n = 6). * p < 0.05. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

the spatial working memory and found that it was impaired in HFD-fed mice as previous reported [3,5].

However, mice were not protected against this cognitive impairment when exposed to LPS and fed an HFD. Interesting, IRS2 was increased in mice LPS+HFD, a negative regulator in memory formation [25], maybe this increase in LPS+HFD cause a worse performance in LPS+HFD in the y-maze than V+HFD. Other authors have reported that the LPS pre-condition protects against chronic stress-induced in juvenile [26], surgery-induced cognitive impairment in aging [27] and anxiety [12]. Perhaps the LPS concentration, doses and critical window exposure in our model were not enough to protect the working memory from impairment caused by exposure to HFD. Spatial working memory depends on the dentate gyrus, a HFD-sensitive structure [5] where synaptic stripping is related to microglia [1]. We explored whether there was a relationship between HFD consumption and the microglial cell numbers and morphological alterations in the dentate gyrus hilus in our model. No differences were observed in the estimated number of microglial cells in response to HFD consumption, as previously reported [5], and the differential morphological changes, such as process length, were as previously reported for other regions [4], although HFD did not change the length and quantity of the microglial processes of mice exposed to LPS which supports tolerance phenotype observed with mRNA expression of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in hippocampus as has been observed in peripheral response with prenatal exposure to LPS [11] and amygdala [12]. Although we found that LPS exposure in the developmental stage causes a resistance to glycemia, insulin and HOMA-IR increase without alterations in microglia morphology and pro-inflammatory cytokines mRNA expression, there was no protection against spatial working memory impairment caused by HFD consumption.

Postnatal days' exposure to immunogens can change the response to HFDs through life, a primed response it cause pro-inflammatory response (trained) as has been observed with immunogens as the second hit instead of HFD, while a desensitized response can cause an anti-inflammatory response (tolerance) to HFDs, which depends from immunogen type and dose as well diet composition. This change in the response to HFDs have a clinical relevance, because can explain why HFDs in some studies have found an increase in the probability to develop diseases, as dementia and in others not [28,29].

5. Conclusion

We suggest that HFD consumption after postnatal LPS exposure induces immune tolerance (anti-inflammatory profile with resistance to morphological changes in microglia) in hippocampus, without prevention in spatial working memory impairment on male mice.

Funding details

Supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA UNAM), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT No. IN204519) and grant Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT- CB- 255399.

CRedit authorship contribution statement

Isaac Vargas-Rodríguez: Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Luis Antonio Reyes-Castro:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft. **Gustavo Pacheco-López:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Resource. **Cosuelo Lomas-Soria:** investigation. **Elena Zambrano:** Resource, Writing – review & editing. **Araceli Díaz-Ruiz:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sofia Diaz-Cintra:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Supervision.

Disclosure statement

Declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available within the manuscript. The corresponding FSTQ sequence files for all samples used in this study were deposited in the NCBI BioProjects repository.

Acknowledgments

Isaac Vargas Rodríguez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), the Instituto de Neurobiología (INB), the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and CONACyT for the support provided to carry out doctoral studies Fellowship 303606. To technical assistant: Azucena Aguilar Vázquez, and personal of the INB-Units: Alejandra G. Castilla León (Bioterio), Elsa Nydia Hernández Ríos (Microscopía), and Deisy Gasca Martínez (Conductual). To Jessica González Norris and Michael Conrad Jeziorski, for proofreading of the manuscript.

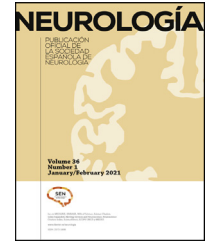
References

- [1] S. Hao, A. Dey, X. Yu, A.M. Stranahan, Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity, *Brain. Behav. Immun.* 51 (2016) 230–239.
- [2] C. Boitard, N. Etchamendy, J. Sauvart, A. Aubert, S. Tronel, A. Marighetto, S. Layé, G. Ferreira, Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice, *Hippocampus* 22 (2012) 2095–2100.
- [3] M.A. Labouesse, O. Lassalle, J. Richetto, J. Iafrati, U. Weber-Stadlbauer, T. Notter, T. Gschwind, L. Pujadas, E. Soriano, A.C. Reichelt, C. Labouesse, W. Langhans, P. Chavis, U. Meyer, Hypervulnerability of the adolescent prefrontal cortex to nutritional stress via reelin deficiency, *Mol. Psychiatry* 22 (2017) 961–971.
- [4] M.E. Bocarsly, M. Fasolino, G.A. Kane, E.A. LaMarca, G.W. Kirschen, I. N. Karatsoreos, B.S. McEwen, E. Gould, Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 15731–15736.
- [5] A. Vinuesa, M. Bentivegna, G. Calfa, F. Filipello, C. Pomilio, M.M. Bonaventura, V. Lux-Lantos, M.E. Matzkin, A. Gregosa, J. Presa, M. Matteoli, J. Beauquis, F. Saravia, Early exposure to a high-fat diet impacts on hippocampal plasticity: implication of microglia-derived exosome-like extracellular vesicles, *Mol. Neurobiol.* 56 (2019) 5075–5094.
- [6] P.D. Cani, J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M. C. Alessi, R. Burcelin, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes* 56 (2007) 1761–1772.
- [7] P. André, F. Laugerette, C. Féart, Metabolic endotoxemia: a potential underlying mechanism of the relationship between dietary fat intake and risk for cognitive impairments in humans? *Nutrients* 11 (2019) 1887.
- [8] J.J. Neher, C. Cunningham, Priming microglia for innate immune memory in the brain, *Trends Immunol.* 40 (2019) 358–374.
- [9] S.D. Bilbo, J.M. Schwarz, Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system, *Front. Behav. Neurosci.* 3 (2009) 14.
- [10] A.-C. Wendeln, K. Degenhardt, L. Kaurani, M. Gertig, T. Ulas, G. Jain, J. Wagner, L. M. Häslér, K. Wild, A. Skodras, T. Blank, O. Staszewski, M. Datta, T.P. Centeno, V. Capece, M.R. Islam, C. Kerimoglu, M. Staufenbiel, J.L. Schultze, M. Beyer, M. Prinz, M. Jucker, A. Fischer, J.J. Neher, Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks, *Nature* 556 (2018) 332–338.
- [11] C.-F. Huang, J.-X. Du, W. Deng, X.-C. Cheng, S.-Y. Zhang, S.-J. Zhao, M.-J. Tao, G.-Z. Chen, X.-Q. Hao, Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre-and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring, *Neuroscience* 286 (2015) 364–370.
- [12] A. Rocha-Gomes, A.E. Teixeira, D.G. de Oliveira, C.M.O. Santiago, A.A. da Silva, T. R. Riul, A.C.R. Lacerda, V.A. Mendonça, E. Rocha-Vieira, H.R. Leite, LPS tolerance prevents anxiety-like behavior and amygdala inflammation of high-fat-fed dams' adolescent offspring, *Behav. Brain Res.* 411 (2021), 113371.
- [13] E. Zambrano, C.J. Bautista, M. Deas, P.M. Martínez-Samayoa, M. Gonzalez-Zamorano, H. Ledesma, P.W. Nathanielsz, A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat, *J. Physiol.* 571 (2006) 221–230.
- [14] G. Paxinos, K.B.J. Franklin, *Mouse, Brain Stereotaxic Coord.* San Diego, CA Acad, Second ed., 2001.
- [15] A. Rosas-Arellano, J.B. Villalobos-González, L. Palma-Tirado, F.A. Beltrán, A. Cárazeb-Trejo, F. Missirlis, M.A. Castro, A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays, *Histochem. Cell Biol.* 146 (2016) 421–430.
- [16] S. Preibisch, S. Saalfeld, P. Tomancak, Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions, *Bioinformatics* 25 (2009) 1463–1465.
- [17] C.W. Ip, D. Cheong, J. Volkmann, Stereological estimation of dopaminergic neuron number in the mouse substantia nigra using the optical fractionator and standard microscopy equipment, *JoVE* (2017), e56103.
- [18] M.J. West, Getting started in stereology, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2013 (2013) 71845.
- [19] K. Young, H. Morrison, Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using ImageJ, *JoVE* (2018), e57648.
- [20] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [21] V. Paternoster, A.P. Rajkumar, J.R. Nyengaard, A.D. Børglum, J. Grove, J. H. Christensen, The importance of data structure in statistical analysis of dendritic spine morphology, *J. Neurosci. Methods* 296 (2018) 93–98.
- [22] E.E. Jackson, E. Rendina-Ruedy, B.J. Smith, V.A. Lacombe, Loss of toll-like receptor 4 function partially protects against peripheral and cardiac glucose metabolic derangements during a long-term high-fat diet, *PLoS One* 10 (2015), e0142077.
- [23] D. Liu, S. Cao, Y. Zhou, Y. Xiong, Recent advances in endotoxin tolerance, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 56–70.
- [24] Z. Wu, Z. Zhang, Z. Lei, P. Lei, CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease, *Cytokine Growth Factor Rev.* 48 (2019) 24–31.
- [25] E.E. Irvine, L. Drinkwater, K. Radwanska, H. Al-Qassab, M.A. Smith, M. O'Brien, K. P. Giese, Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation, *Learn. Mem.* 18 (2011) 375–383.
- [26] Y. Gu, T. Ye, P. Tan, L. Tong, J. Ji, Y. Gu, Z. Shen, X. Shen, X. Lu, C. Huang, Tolerance-inducing effect and properties of innate immune stimulation on chronic stress-induced behavioral abnormalities in mice, *Brain Behav. Immun.* 91 (2021) 451–471.
- [27] Z. Zhang, M. Ji, Y. Liao, J. Yang, J. Gao, Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharide preconditioning protects against surgery-induced cognitive impairment in aging mice, *Mol. Med. Rep.* 17 (2018) 3845–3852.
- [28] J.L. Dearborn-Tomazos, A. Wu, L.M. Steffen, C. Anderson, E.A. Hu, D. Knopman, T. H. Mosley, R.F. Gottesman, Association of dietary patterns in midlife and cognitive function in later life in US adults without dementia, *JAMA Netw. Open* 2 (12) (2019), 1916641 e1916641-e1916641.
- [29] T.N. Akbaraly, A. Singh-Manoux, A. Dugravot, E.J. Brunner, M. Kivimäki, S. Sabia, Association of midlife diet with subsequent risk for dementia, *JAMA* 321 (10) (2019) 957–968.



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



REVIEW ARTICLE

Oxidative stress, the immune response, synaptic plasticity, and cognition in transgenic models of Alzheimer disease*

P.C. Bello-Medina^a, D.A. González-Franco^b, I. Vargas-Rodríguez^a, S. Díaz-Cintra^{a,*}

^a *Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro, Mexico*

^b *Facultad de Psicología, Universidad Latina de México, Celaya, Guanajuato, Mexico*

Received 3 May 2019; accepted 27 June 2019

KEYWORDS

3xTg-AD;
Microglia;
Synaptic plasticity;
Free radicals;
Alzheimer;
Hippocampus

Abstract

Introduction: Worldwide, approximately 50 million people have dementia, with Alzheimer disease (AD) being the most common type, accounting for 60%-70% of cases. Given its high incidence, it is imperative to design studies to expand our knowledge about its onset and development, and to develop early diagnosis strategies and/or possible treatments. One methodological strategy is the use of transgenic mouse models for the study of the factors involved in AD aetiology, which include oxidative stress and the immune response.

Development: We searched the PubMed, Scopus, and Google Scholar databases for original articles and reviews published between 2013 and 2019. In this review, we address 2 factors that have been studied independently, oxidative stress and the immune response, in transgenic models of AD, and discuss the relationship between these factors and their impact on the loss of synaptic and structural plasticity, resulting in cognitive impairment.

Conclusion: This review describes possible mechanisms by which oxidative stress and the immune response participate in the molecular, cellular, and behavioural effects of AD, observing a close relationship between these factors, which lead to cognitive impairment.

© 2019 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Please cite this article as: Bello-Medina PC, González-Franco DA, Vargas-Rodríguez I, Díaz-Cintra S. Estrés oxidativo, respuesta inmune, plasticidad sináptica y cognición en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.06.002>

* Corresponding author.

E-mail address: yoldi@unam.mx (S. Díaz-Cintra).

PALABRAS CLAVE

3xTg-AD;
Microglía;
Plasticidad sináptica;
Radicales libres;
Alzheimer;
Hipocampo

Estrés oxidativo, respuesta inmune, plasticidad sináptica y cognición en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer**Resumen**

Introducción: En el mundo, alrededor de 50 millones de personas padecen demencia; la forma más común es la enfermedad de Alzheimer (EA), que representa el 60–70% de los casos. Dada su alta incidencia, se hace imperativo diseñar estudios que permitan ampliar el conocimiento sobre su aparición y desarrollo, para proponer diagnósticos tempranos y/o posibles tratamientos. Una de las estrategias metodológicas que se han desarrollado son los modelos transgénicos murinos para el estudio de los factores involucrados en su etiología, y entre ellos, el estrés oxidativo y la respuesta inmune.

Desarrollo: Se realizó una búsqueda de artículos originales y revisiones en PubMed, Scopus y Google Scholar (2013–2019). En esta revisión abordamos dos factores que han sido estudiados de forma independiente: el estrés oxidativo y la respuesta inmune en modelos transgénicos para la EA, y se discute la relación que existe entre ellos y que impacta en la pérdida de la plasticidad sináptica y estructural, produciendo como efecto final el deterioro cognitivo.

Conclusión: Esta revisión describe posibles mecanismos en donde participan el estrés oxidativo y la respuesta inmune sobre los efectos moleculares, celulares y conductuales en la EA, observando una estrecha relación entre estos elementos que conducen hacia el deterioro cognitivo.

© 2019 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Dementia is a syndrome, normally chronic or progressive, that causes cognitive impairment. Nearly 50 million people worldwide have dementia, and the incidence increases every year. Several forms of dementia have been described, with the most common being Alzheimer disease (AD), which accounts for 60%-70% of cases.¹

AD is a neurodegenerative disorder characterised by presence in the brain of diffuse neuritic plaques containing beta amyloid protein (A β) and neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau protein.²

AD is a multifactorial neurodegenerative disease; research is constantly identifying new factors involved in the appearance and progression of the disease. This complicates the study and design of treatments that focus on the symptomatic phase of AD.

The use of transgenic mouse models of AD has provided much information on the appearance, progression, and early and late diagnosis of the disease, as well as on possible prevention strategies, including symptomatic treatments or even the design of new treatments aimed at eliminating this type of dementia. However, the animal models currently available do not replicate all the symptoms observed in humans. In this review of studies with transgenic mouse models, we use the term AD to refer to Alzheimer-type disease in a broader sense.

Over 160 transgenic animal models of AD are currently available, and differ according to the mutated gene and the number of overexpressed proteins. The most frequently used models of AD are shown in Table 1; some are double- or triple-transgenic models based on the metabolism of the amyloid precursor protein (APP), presenilin, or both. Other models are based on tau protein metabolism, and some are triple-transgenic models expressing presenilin/APP/tau (Manzano et al., 2009). Some lines present alterations in apolipoprotein E (ApoE), and are used to study the effects of A β oligomers (soluble toxic species).

In this review, we focus on the role of oxidative stress and the immune response on AD in different transgenic animal models of

the disease. We also analyse the impact of the disease on synaptic plasticity and cognition.

Oxidative stress

Oxidative stress has been widely linked to neurodegenerative diseases,^{3–5} including AD.^{6–9} Oxidative stress and A β oligomerisation precede the onset of clinical dementia in AD.¹⁰ Studies with several mouse strains serving as transgenic models of AD have revealed increased levels of oxidative stress markers.¹¹

The brain is particularly vulnerable to oxidative stress due to its high demand for oxygen, high levels of polyunsaturated fatty acids, low levels of antioxidants, and relatively high concentration of transition metal ions.^{12,13}

Transgenic mice expressing different mutations linked to AD have enabled research into the role of oxidative stress in the disease. It should be noted that oxidative stress markers (most of which are lipid peroxidation products) are detectable before the appearance of A β plaques and cognitive alterations, which suggests that these markers may help in early diagnosis of the condition.^{7,14}

One of the main hallmarks of oxidative stress is lipid peroxidation, which results in the formation of F2-isoprostanes, F4-neuroprostanes, malondialdehyde, and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE); these molecules are used as in vivo biomarkers of oxidative stress.^{14–17} Oxidative stress also causes protein oxidation, the main marker of which is protein carbonylation,^{18,19} and oxidation of nitrogenous bases, with 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) and 8-hydroxyguanosine (8-OHG) being the main markers of oxidative stress to DNA and RNA, respectively.^{20–22}

Table 1 Articles including transgenic mouse models of AD (3xTg-AD, 5xFAD, Tg2576, APP/PS1, and rTg4510) published on PubMed in the last 5 years (2015-2019). Four of these models are based on the metabolism of the amyloid precursor protein (APP), 3 feature mutations in the *PSEN1* gene, and only 2 present a mutation in the *MAPT* gene.

Model	Mutated genes or overexpressed proteins	No. articles published				
		2019	2018	2017	2016	2015
3xTg-AD	APP, <i>PSEN1</i> , <i>MAPT</i>	10	47	44	39	49
5xFAD	APP, <i>PSEN1</i>	12	67	62	50	56
Tg2576 score	APP	8	20	41	42	58
APP/PS1	APP, <i>PSEN1</i>	2	26	19	29	16
rTg4510	<i>MAPT</i>	3	12	8	9	6

For example, the Swedish *APP* mutation found in Tg2576 transgenic mice induces an increase in F2-isoprostane levels in the urine, plasma, and brain tissue at 8 months of age, i.e., 2-4 months before the appearance of A β plaques and spatial memory impairment. This increase becomes more marked at the age of 12 and 18 months, which has been correlated with onset and progression of A β accumulation.²³ Furthermore, increased detection of HNE immunoreactivity has been observed in dystrophic neurites adjacent to A β plaques.²⁴ Regarding direct oxidation of proteins, increased levels of protein carbonyls have been observed in the hippocampus of transgenic mice.^{25–27}

The Thy1–APP_{751SL} mouse strain presents reduced activity of the Cu/Zn-SOD antioxidant enzyme and increased lipid peroxidation, as detected with the HNE marker. This mouse strain is characterised by overexpression of the 751 isoform of human APP (APP₇₅₁) and carries the London and Swedish mutations, which induce high expression of APP, high A β levels, and onset of plaque formation at the age of 6 months.²⁸

The PDGF-APP_{695SDL} line, which presents the 695 isoform and carries the Swedish, Dutch, and London mutations, presents lower A β plaque load, with A β accumulation being observable until the age of 18 months.²⁸ This mouse strain does not present decreased Cu/Zn-SOD activity or increased lipid peroxidation, which suggests that the decrease in antioxidant activity that leads to oxidative stress is linked to β -amyloidogenic cleavage of APP.²⁹

In transgenic mice carrying *PSEN1*, the gene has been shown to induce early A β ₄₂ accumulation in senile plaques.³⁰ Mice expressing human mutant *PS1* present increased levels of oxidative stress markers, protein carbonylation, and HNE.³¹ Furthermore, APP/*PSEN1* double-transgenic mice present higher levels of these markers, as well as increased F2-isoprostane levels.^{31,32}

PS19 transgenic mice have been used extensively in the study of tauopathy in AD, and express the P301S mutant form of the human tau protein. They present iron overload in the cortex and hippocampus at 7.5 months of age.³³ Iron accumulation has been linked to hyperphosphorylated tau aggregation and redox imbalance.³⁴ Furthermore, PS19 transgenic mice also present decreased expression of antioxidant enzymes GPx4, xCT, and SOD1, and decreased SOD activity.³³ Research has also shown that transgenic mice expressing human tau protein present increased protein carbonylation in the cerebral cortex and increased levels of 8-oxo-dG, a marker of oxidative damage to nucleic acids.³⁵

Triple-transgenic mice (3xTg-AD) expressing PS1(M146V), APP(Swe), and tau(P301L) transgenes³⁶ have been shown to present lower levels of glutathione and vitamin E and increased lipid peroxidation. They also present greater glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. These alterations are detectable during A β oligomerisation and before the appearance of A β plaques and neurofibrillary tangles, indicating that oxidative stress occurs early in the course of the disease.³⁷

A recent study also observed that the hippocampus of 3xTg-AD mice presents a twofold increase in levels of reactive oxygen species and reactive nitrogen species, which explains the accumulation of such markers of lipid peroxidation as HNE, malondialdehyde, and 8-iso-PGF₂.³⁸ In terms of protein damage, increased protein carbonylation and tyrosine nitration have been reported.^{19,38} Lastly, research has also shown an increase in the levels of 8-oxo-dG and 8-OHG (markers of DNA and RNA oxidative damage, respectively).³⁸

Immune response and microglia

The role of inflammation in AD was first described, almost simultaneously, by Oskar Fischer and Alois Alzheimer, although for many years little attention was paid to the study of the immune response in the central nervous system of these patients. In recent years, this topic has become increasingly important,³⁹ as new evidence suggests that inflammation plays a causal role in AD, with its contribution to disease pathogenesis being equally or even more significant than that of tau and A β .⁴⁰

Genome-wide association studies have found an association between the microglial immune response and AD.⁴¹ Most of the genes identified as risk factors are present in the microglia, as is the case with *TREM2* and *APOE*.^{41,42}

The microglia may present a proinflammatory response in AD: post mortem studies have shown that the morphology of microglial cells associated with A β plaques and/or neurofibrillary tangles is similar to that of microglial cells in such proinflammatory events as sepsis. Cells presenting morphological alterations are known as dystrophic or senescent microglia.⁴³ It has been suggested that dystrophic microglia, rather than proinflammatory microglia, may be related to synaptic dysfunction and neurodegeneration in AD.⁴³ The microglial phenotype of the 5xFAD transgenic mouse model differs from the proinflammatory phenotype, and has been termed DAM (disease-associated microglia); this phenotype

is characterised by *TREM2* and *APOE* overexpression.⁴⁴ Likewise, *APP/PS1* transgenic mice are reported to present a different microglial phenotype from the proinflammatory phenotype near A β plaques; this phenotype has been termed MGnD (microglial neurodegenerative phenotype). These microglial phenotypes observed in the 3 transgenic mouse models of AD overexpress *TREM2* and *APOE*,⁴⁵ which have been associated with increased risk of developing AD.⁴⁶ It should be noted that the expression of these genes is inhibited by the proinflammatory microglial phenotype induced by lipopolysaccharide or interferon- γ .⁴⁵

During postnatal development, microglia play a significant role in eliminating neurons that do not belong to functional circuits and in remodelling synapses via the C1q and C3 proteins of the complement pathway.⁴⁷ Unused synapses are tagged by these complement pathway proteins and subsequently recognised by microglial complement receptor 3 (CR3) for clearance.⁴⁷ This process is known as trogocytosis,[†] and only affects presynaptic boutons and axons.⁴⁸ This finding is interesting since the main characteristic of AD is presence of A β plaques and neurofibrillary tangles; other characteristics include synaptic loss, cognitive impairment, and neurodegeneration in advanced stages,⁴⁹ in which microglia are also thought to play a role.

Amyloidogenic models such as 5xFAD transgenic mice display synaptic dysfunction, synaptic loss, and neuronal death.⁵⁰ However, microglial elimination prevents the loss of dendritic spines and neurons without changes in A β levels or A β plaque size, which suggests that the microglial phenotype observed in this animal model is responsible for dendritic spine loss and neuronal death.^{42,51} A β has been found to play a major role in dendritic pruning, since DAM and MGnD phenotypes are observed in advanced stages of AD in amyloidogenic mouse models, but not in non-transgenic mice.^{44,45} Furthermore, A β oligomers can activate the complement pathway, causing C1q to tag synapses for subsequent recognition by CR3 and elimination by microglia.⁵²

A β plaques have been shown to contain complement pathway proteins³⁹; in non-transgenic mice, C3 and CR3 favour A β phagocytosis by microglial cells.⁵³ This suggests that complement pathway proteins tag A β plaques, making them recognisable by microglia for subsequent clearance.

Such amyloidogenic models as *APP* transgenic mice have shown that CR3 decreases microglial phagocytic activity⁵⁴; ablation of C3 in *APP/PS1* mice prevents synaptic loss, despite increased A β plaque load.⁵⁵ The differences observed between non-transgenic models and *APP/PS1* transgenic models may be explained by the microglial phenotype; this suggests that C3 and CR3 may protect neurons in the proinflammatory phenotype but promote synaptic loss and neurodegeneration in the DAM and MGnD phenotypes.

Interestingly, the DAM and MGnD phenotypes overexpress *TREM2* in the vicinity of A β plaques,^{44,45} since this receptor

displays a preference for A β oligomers,⁴⁶ which may induce synaptic elimination via the complement pathway.⁵²

One important question remains: why do microglia lose homeostasis and eliminate synapses in an uncontrolled manner? A plausible hypothesis is that the gene encoding C-X3-C motif chemokine receptor 1 (*CX3CR1*) is involved in this process; this gene inhibits microglia and its expression is reduced in early stages in amyloidogenic transgenic models, which may cause *TREM2* overexpression in advanced stages of the disease.⁴⁴

Microglia have also been found to play a major role in the *MAPT P301S* transgenic model (whose main characteristic is the development of tauopathy), since clearance of this cell type and of senescent astrocytes prevents fibrillary tangle deposition and neurodegeneration.⁵⁶ This suggests that, as occurs in amyloidogenic models, some microglial phenotype other than the proinflammatory phenotype is involved in AD.

Synaptic plasticity and cognition

Synaptic plasticity is the mechanism that induces changes in synaptic efficiency as a result of high-frequency, experience-dependent neuronal activity.⁵⁷ It involves a wide range of structural and functional changes, including long-term potentiation, synaptogenesis, axonal and dendritic remodelling, and in some cases adult neurogenesis.⁵⁸

Some of these mechanisms of structural synaptic plasticity involve synaptic remodelling, that is, structural changes in dendrites, specifically in dendritic spines. Dendritic spines are cellular compartments mainly composed of cytoskeletal elements.⁵⁹ Their internal structure contains a protein complex termed postsynaptic density, which anchors a wide range of molecules, including such neurotransmitter receptors as the AMPA, NMDA, and kainate receptors.⁶⁰ The morphology of dendritic spines varies, and is classified into different types, including thin, mushroom, and stubby spines.⁶¹ Dendritic spine morphology is linked to their function: thin spines have been associated with such cognitive processes as learning, whereas mushroom spines have been associated with memory⁶² and stubby spines are thought to regulate excitability by regulating calcium ions.⁶³

Such brain structures as the hippocampus, amygdala, striatum, and cortex participate actively in information processing during learning and memory processes; these cognitive processes induce changes in synaptic plasticity in normal conditions,^{64–68} but are impaired in patients with AD and transgenic models of the disease. Transgenic models have been used to study the impact of AD on synaptic plasticity at the molecular, cellular, and cognitive/behavioural levels.

At the molecular level, 3-month-old female 3xTg-AD mice have been observed to display increased expression of *GluA3* and *GluA4* in the hippocampus. However, expression decreased at the age of 12 months, as compared to non-transgenic mice,⁶⁹ which suggests that the glutamatergic transmission system is impaired in AD. Likewise, altered expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein (*Arc*) has been observed in the dorsal hippocampus of 3xTg-AD mice. *Arc* has been used as a marker of neuronal activity,⁷⁰ since the gene encoding the protein is an

[†] Trogocytosis has been described in the immune system as a non-apoptotic mechanism for the rapid capture of cell membrane components. It differs from phagocytosis in that the former involves engulfment and elimination of cellular structures measuring $>1 \mu\text{m}$.⁴⁸

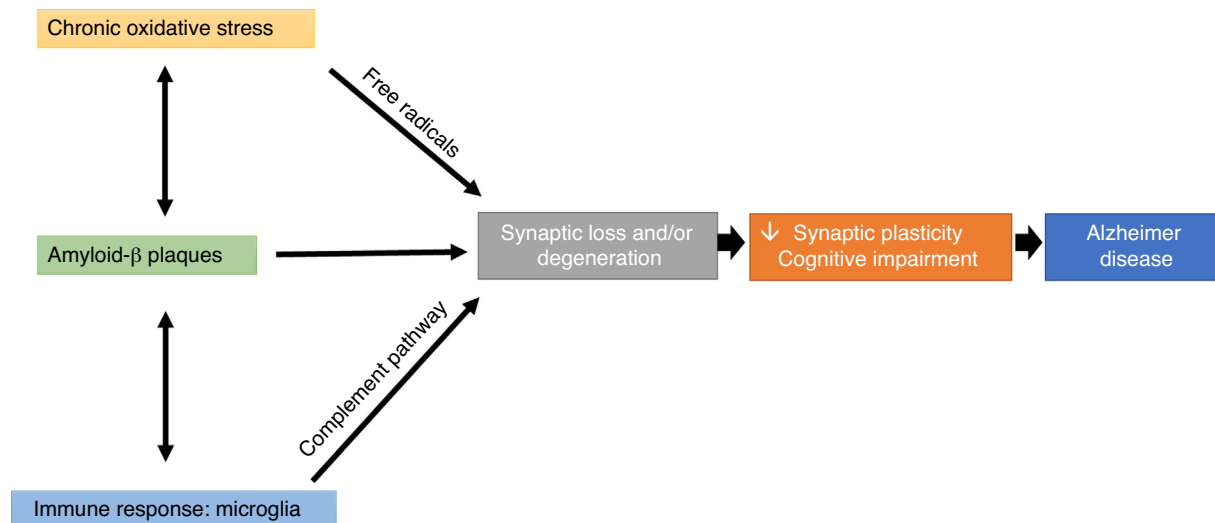


Figure 1 Effects of alterations in redox balance (chronic oxidative stress), immune response (microglial trogocytosis), and A β plaque formation on loss of structural synaptic plasticity, which results in a pattern of cognitive impairment characteristic of Alzheimer disease.

immediate-early gene, as well as a marker of synaptic plasticity due to its involvement in AMPA receptor endocytosis and synaptic scaling.⁷¹ Arc expression is increased in the hippocampal CA3 region of 10-month-old male 3xTg-AD mice. However, when mice are trained in the Morris water maze, Arc expression does not change with respect to baseline values; furthermore, most Arc-expressing cells are neurons presenting A β plaques.⁷² Recent evidence suggests that Arc plays a relevant role in synaptopathy in AD.⁷³

A study with one-month-old male 3xTg-AD mice showed that tau phosphorylation is associated with changes in hippocampal theta oscillations and decreases the excitability of neurons in the CA1 region and subiculum.⁷⁴ Other studies with this animal model have also shown long term potentiation deficits secondary to the formation of A β plaques and fibrillary tangles.⁷⁵ A study including 3xTg-AD mice aged 12-16 months found an increase in voltage-dependent Ca²⁺ currents in the hippocampal CA1 region, which increased Ca²⁺ concentration within neurons,⁷⁶ resulting in neuronal excitotoxicity.^{77,78}

Neurotransmission activates multiple specific signalling cascades, depending on the receptor activated and the experience of the individual. Some of these signalling pathways induce the expression of genes that encode structural proteins, which are responsible for dynamic restructuring of neurons, as is the case with dendritic spines.

In 13-month-old A β PP/PS1 transgenic mice, AD has been observed to alter the levels of such proteins as ERK44, pERK44, c-Fos, mTOR, and A β PP in the parietal cortex and the CA1 region and dentate gyrus of the dorsal hippocampus.⁷⁹ This indicates impairment of the signalling cascades involving these proteins; as a result, downstream molecular signalling is also altered. This has an indirect impact on molecules involved in structural synaptic plasticity, such as Ca²⁺/calmodulin/CaMKII/CaV1.2,⁸⁰ which affect such cytoskeletal proteins as F-actin. This is another pathway that may interfere in structural synaptic plasticity; as previously mentioned, microglial trogocytosis also causes synaptic loss, which may lead to dendritic spine loss.

In APP/PS1 transgenic mice of 1-2 months of age, A β protein has been found to induce F-actin depolymerisation, which in turn decreases dendritic spine density.⁸¹ Likewise, 4-month-old APP23 and APPsw/PS1dE9 transgenic mice show lower dendritic spine density near A β plaques and a decrease in the number of mushroom spines, which are linked to such cognitive processes as memory.⁸²

In animal models of AD, synaptic dysfunction has been linked to cognitive impairment. 3xTg-AD mice have been observed to perform poorly in innate and learned behavioural paradigms. Regarding learned behaviour, these animals spend less time in the open arms of the elevated plus maze and present a lower object discrimination index, as well as long-term retention deficits in the Morris water maze.⁸³ Studies with female 3xTg-AD mice aged 8-9 and 11 months old have reported shorter distance travelled in the open field and longer time spent in inner square.^{84,85} In this transgenic model, researchers also report poorer acquisition in female mice of 8-9 months of age,⁸⁴ and impaired long-term memory formation in 10-month-old male and female mice trained in the Morris water maze.^{69,72} Memory has also been found to be impaired in fear conditioning and T-maze paradigms.⁸⁶ Regarding innate behaviour, 11-month-old female 3xTg-AD mice have been observed to display alterations in nesting behaviour.⁸⁷

Conclusions

In transgenic animal models, AD is considered a multifactorial disease involving numerous elements at different stages. Significant interaction is also reported between these factors, aggravating cognitive impairment.

Cognitive impairment is a typical symptom of AD that results from the interaction between oxidative stress and the immune response, which have a direct impact on structural synaptic plasticity, specifically in studies with different transgenic models of AD.

Interestingly, microglial cells are involved in this process, through complement-mediated synaptic trogocytosis; this may

entail a loss of dendritic spines, a key element in memory formation (Fig. 1).

Oxidative stress and the immune system may modulate the appearance and development of A β plaques, which directly affect synaptic transmission, altering cognitive processes (Fig. 1).

Studies with transgenic models of AD have evaluated multiple behavioural paradigms, frequently reporting cognitive impairment at different ages (i.e., at different stages of the disease). However, some elements have not been considered in the assessment of the effect of AD on behavioural task performance, with the most relevant being stress. Some behavioural tasks induce the release of high levels of stress hormones, which may interfere with learning and memory consolidation. Another element is motor activity: multiple studies have shown that AD has a negative impact on motor function in transgenic animal models. The results of these studies reflect cognitive impairment, which may be masked by the motor deficits reported.

Funding

This study was funded by the Support Programme for Research and Technological Innovation (PAPIIT-IN-203616) and by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT CB-255399), through a doctoral scholarship to IVR (CONACyT 303606).

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We wish to thank laboratory technician Azucena Aguilar Vázquez. This study was conducted during PCBM's postdoctorate fellowship at the Laboratory of Neuromorphometry and Development of the UNAM's Neurobiology Institute.

References

1. World Health Organization. *Dementia*; 2017.
2. Martins RN, Villemagne V, Sohrabi HR, Chatterjee P, Shah TM, Verdile G, et al. Alzheimer's disease: a journey from amyloid peptides and oxidative stress, to biomarker technologies and disease prevention strategies-gains from AIBL and DIAN Cohort studies. *J Alzheimer's Dis.* 2018;62:965–92, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-171145>.
3. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2017;39:73–82, <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>.
4. Chen L, Liu B. Relationships between stress granules, oxidative stress, and neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–10, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1809592>.
5. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53:4094–125, <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>.
6. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 2018;14:450–64, <http://dx.doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.10.014>.
7. Pohanka M. Oxidative stress in Alzheimer disease as a target for therapy. *Bratislava Med J.* 2018;119:535–43, <http://dx.doi.org/10.4149/BLL.2018.097>.
8. Pohanka M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Curr Med Chem.* 2014;21:356–64, <http://dx.doi.org/10.2174/09298673113206660258>.
9. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014;30:271–81, <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>.
10. Wojsiat J, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. Oxidant/antioxidant imbalance in Alzheimer's disease: therapeutic and diagnostic prospects. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1–16, <http://dx.doi.org/10.1155/2018/6435861>.
11. Sonnen JA, Breitner JC, Lovell MA, Markesbery WR, Quinn JF, Montine TJ. Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:219–30, <http://dx.doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.04.022>.
12. Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2009;16:741–61, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2009-0972>.
13. Butterfield DA. Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.* 2002;36:1307–13, <http://dx.doi.org/10.1080/1071576021000049890>.
14. Bradley-Whitman MA, Lovell MA. Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Arch Toxicol.* 2015;89:1035–44, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-015-1517-6>.
15. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, et al. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:9383–7.
16. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482:419–25, <http://dx.doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.10.086>.
17. Peña-Bautista C, Baquero M, Vento M, Cháfer-Pericás C. Free radicals in Alzheimer's disease: lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta.* 2019;491:85–90, <http://dx.doi.org/10.1016/J.CCA.2019.01.021>.
18. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33:79–97, <http://dx.doi.org/10.1002/mas.21381>.
19. Shen L, Chen Y, Yang A, Chen C, Liao L, Li S, et al. Redox proteomic profiling of specifically carbonylated proteins in the serum of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Int J Mol Sci.* 2016;17:469, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17040469>.
20. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:4533–7, <http://dx.doi.org/10.1073/PNAS.87.12.4533>.
21. Cattley RC, Glover SE. Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization. *Carcinogenesis.* 1993;14:2495–9.
22. Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol.* 2018;14:669–78, <http://dx.doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.11.008>.
23. Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci.* 2001;21:4183–7, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04183.2001>.

24. Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PLR, Beal MF, Kowall N, et al. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:731–5, <http://dx.doi.org/10.1177/002215549804600605>.
25. Lim G, Yang F, Chu T, Gahtan E, Uboda O, Beech W, et al. Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 2001;22:983–91, [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00299-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00299-8).
26. Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Uboda O, et al. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron.* 2004;43:633–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.013>.
27. Cole GM, Frautschy SA. Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nutr Health.* 2006;18:249–59, <http://dx.doi.org/10.1177/026010600601800307>.
28. Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, et al. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol.* 2003;184:247–63, [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00252-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00252-8).
29. Schuessel K, Schäfer S, Bayer TA, Czech C, Pradier L, Müller-Spahn F, et al. Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2005;18:89–99, <http://dx.doi.org/10.1016/J.NBD.2004.09.003>.
30. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada C-M, Perez-tur J, et al. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 1996;383:710–3, <http://dx.doi.org/10.1038/383710a0>.
31. Mohammad Abdul H, Wenk GL, Gramling M, Hauss-Wegrzyniak B, Butterfield DA. APP and PS-1 mutations induce brain oxidative stress independent of dietary cholesterol: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2004;368:148–50, <http://dx.doi.org/10.1016/J.NEULET.2004.06.077>.
32. Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer RM, Montine TJ, et al. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005;25:10180–7, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3591-05.2005>.
33. Zhang Y-H, Wang D-W, Xu S-F, Zhang S, Fan Y-G, Yang Y-Y, et al. α -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice. *Redox Biol.* 2018;14:535–48, <http://dx.doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.11.001>.
34. Yamamoto A, Shin R-W, Hasegawa K, Naiki H, Sato H, Yoshimasu F, et al. Iron(III) induces aggregation of hyperphosphorylated τ and its reduction to iron(II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2004;82:1137–47, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.t01-1-01061.x>.
35. Nakashima H, Ishihara T, Yokota O, Terada S, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, et al. Effects of α -tocopherol on an animal model of tauopathies. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:176–86, <http://dx.doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.04.037>.
36. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003;39:409–21, [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3).
37. Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:2051–7, <http://dx.doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.03.012>.
38. Marwarha G, Claycombe-Larson K, Lund J, Schommer J, Ghribi O. A diet enriched in palmitate and deficient in linoleate exacerbates oxidative stress and amyloid- β burden in the hippocampus of 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2019;68:219–37, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-180835>.
39. Cuello AC. Early and late CNS inflammation in Alzheimer's disease: two extremes of a continuum? *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38:956–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.07.005>.
40. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Gary E, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015;14:388–405, <http://dx.doi.org/10.1201/9781315381572>.
41. Mhatre SD, Tsai CA, Rubin AJ, James ML, Andreasson KI. Microglial malfunction: the third rail in the development of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2015;38:621–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.006>.
42. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain.* 2016;139:1265–81, <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aww016>.
43. Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118:475–85, <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>.
44. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell.* 2017;169:1276–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>.
45. Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity.* 2017;47:566–81.e9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>.
46. Shi Y, Holtzman DM. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nat Rev Immunol.* 2018;18:759–72, <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0051-1>.
47. Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:441–68, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.
48. Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun.* 2018;9:1–14, <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>.
49. Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony. *Trends Neurosci.* 2017;40:347–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002>.
50. Buskila Y, Crowe SE, Ellis-Davies GCR. Synaptic deficits in layer 5 neurons precede overt structural decay in 5xFAD mice. *Neuroscience.* 2013;254:152–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.016>.
51. Spangenberg EE, Green KN. Inflammation in Alzheimer's disease: lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun.* 2017;61:1–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.003>.
52. Hong S, Beja-Glasser V, Nfonoyim B, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science.* 2016;352:712–6, <http://dx.doi.org/10.1126/science.125252-z>.
53. Fu H, Liu B, Frost JL, Hong S, Jin M, Ostaszewski B, et al. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clear-

- ance of fibrillar A β by microglia. *Glia*. 2012;60:993–1003, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22331>.
54. Czirr E, Castello NA, Mosher KI, Castellano JM, Hinkson IV, Lucin KM, et al. Microglial complement receptor 3 regulates brain A β levels through secreted proteolytic activity. *J Exp Med*. 2017;214:1081–92, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20162011>.
 55. Shi Q, Chowdhury S, Ma R, Le KX, Hong S, Caldarone BJ, et al. Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaaf6295, <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6295>.
 56. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*. 2018;562:578–82, <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y>.
 57. Li J, Park E, Zhong LR, Chen L. Homeostatic synaptic plasticity as a metaplasticity mechanism — a molecular and cellular perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 2019;54:44–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.010>.
 58. Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P. Synaptic plasticity, dementia and Alzheimer disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2017;16:220–33, <http://dx.doi.org/10.2174/1871527314666150116125506>.
 59. Sala C, Segal M. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*. 2014;94:141–88, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00012.2013>.
 60. Yuste R, Majewska A. Book Review: On the function of dendritic spines. *Neurosci*. 2001;7:387–95, <http://dx.doi.org/10.1177/107385840100700508>.
 61. Harris KM. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9:343–8, [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80050-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80050-6).
 62. Bourne J, Harris KM. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17:381–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>.
 63. González-Burgos I. *Synaptic fundamentals of memory performance*. New York, NY: Nova; 2015.
 64. Leuner B, Falduo J, Shors TJ. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci*. 2003;23:659–65, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00659.2003>.
 65. González-Franco DA, Ramírez-Amaya V, Joseph-Bravo P, Prado-Alcalá RA, Quirarte GL. Differential arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;140:17–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.001>.
 66. González-Salinas S, Medina AC, Alvarado-Ortiz E, Antaramian A, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Retrieval of inhibitory avoidance memory induces differential transcription of arc in striatum, hippocampus, and amygdala. *Neuroscience*. 2018;382:48–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.031>.
 67. Bello-Medina PC, Flores G, Quirarte GL, McGaugh JL, Prado-Alcalá RA. Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E6516–25, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1613680113>.
 68. Schafe GE, Nader K, Blair HT, Ledoux JE. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci*. 2001;24:540–6, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01969-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01969-X).
 69. Cantanelli P, Sperduti S, Ciavardelli D, Stuppia L, Gatta V, Sensi SL. Age-dependent modifications of AMPA receptor subunit expression levels and related cognitive effects in 3xTg-AD mice. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:1–11, <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2014.00200>.
 70. Ramírez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci*. 2006;26:12237–41, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2195-06.2006>.
 71. Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, et al. The arc of synaptic memory. *Exp Brain Res*. 2010;200:125–40, <http://dx.doi.org/10.1007/s00221-009-1959-2>.
 72. Morin JP, Cerón-Solano G, Velázquez-Campos G, Pacheco-López G, Bermúdez-Rattoni F, Díaz-Cintra S. Spatial memory impairment is associated with intraneural amyloid immunoreactivity and dysfunctional arc expression in the hippocampal-CA3 region of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2016;51:69–79, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-150975>.
 73. Kerrigan TL, Randall AD. A new player in the "synaptopathy" of Alzheimer's disease — Arc/Arg 3.1. *Front Neurol*. 2013;4:1–7, <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2013.00009>.
 74. Siddhartha MR, Anahi SG, Perla GP, Macías M, Ordaz B, Fernando PO, et al. Phosphorylation of Tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model. *J Biol Chem*. 2018;293:8462–72, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA117.001187>.
 75. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39:409–21, [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3).
 76. Wang Y, Mattson MP. L-type Ca²⁺ currents at CA1 synapses, but not CA3 or dentate granule neuron synapses, are increased in 3xTgAD mice in an age-dependent manner. *Neurobiol Aging*. 2014;35:88–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.007>.
 77. Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*. 2001;38:713–21, [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00108-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00108-0).
 78. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol*. 2015;6:260–71, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>.
 79. Guillot F, Kempainen S, Lavasseur G, Miettinen PO, Laroche S, Tanila H, et al. Brain-specific basal and novelty-induced alternations in PI3K-Akt and MAPK/ERK signaling in a middle-aged A β PP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2016;51:1157–73, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-150926>.
 80. Min D, Guo F, Zhu S, Xu X, Mao X, Cao Y, et al. The alterations of Ca²⁺/calmodulin/CaMKII/CaV1.2 signaling in experimental models of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett*. 2013;538:60–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.001>.
 81. Kommaddi RP, Das D, Karunakaran S, Nanguneri S, Bapat D, Ray A, et al. A β mediates F-actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2017;38:1085–99, <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2127-17.2017>.
 82. Zou C, Montagna E, Shi Y, Peters F, Blázquez-Llorca L, Shi S, et al. Intraneuronal APP and extracellular A β independently cause dendritic spine pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2015;129:909–20, <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1421-4>.
 83. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol*. 2013;47:711–25, <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-012-8375-5>.
 84. Wei Z, Junhong G, Xiaoyuan N, Jie W, Zhaojun W, Meina W, et al. Citalopram ameliorates impairments in spatial memory

- and synaptic plasticity in female 3xTgAD mice. *Biomed Res Int.* 2017;2017, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1238687>.
85. Orta-Salazar E, Feria-Velasco AI, Díaz-Cintra S. Alteraciones en la corteza motora primaria en la enfermedad de Alzheimer: estudio en el modelo 3xTg-AD. *Neurología.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2017.02.016>.
86. Davis KE, Burnett K, Gigg J. Water and T-maze protocols are equally efficient methods to assess spatial memory in 3xTg Alzheimer's disease mice. *Behav Brain Res.* 2017;331:54–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.005>.
87. Orta-Salazar E, Feria-Velasco A, Medina-Aguirre GI, Díaz-Cintra S. Morphological analysis of the hippocampal region associated with an innate behaviour task in the transgenic mouse model (3xTg-AD) for Alzheimer disease. *Neurología.* 2013;28:497–502, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2013.01.014>.