

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



# Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0  
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

## Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

**Adaptar** — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

## Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



**CompartirIgual** — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

## Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.



**Departamento de  
FARMACOLOGÍA  
Otto Orsingher**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

I F E C

# **Efecto de $\alpha$ -MSH sobre el deterioro cognitivo inducido por neuroinflamación asociada al consumo de una dieta rica en grasas.**

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Lucia Guadalupe Ximena Herrera

Bioquímica

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Farmacología Otto Orsingher  
Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET)  
Córdoba, Argentina  
2023

## **Comisión de tesis**

### **Directora:**

**Dra. Teresa Nieves Scimonelli.** Departamento de Farmacología Otto Orsingher. Facultad de Ciencias Químicas, UNC. IFEC-CONICET.

### **Comisión Evaluadora:**

**Dra. Andrea Beatriz Cragolini.** Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, CONICET-UNC.

**Dr. Gabriel Ricardo Cuadra.** Departamento de Farmacología Otto Orsingher. Facultad de Ciencias Químicas, UNC. IFEC-CONICET.

**Dr. Pablo Iribarren.** Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas, UNC. CIBICI-CONICET.

### **Evaluadora Externa:**

**Dra. María José Bellini.** Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner" – CONICET.

El presente trabajo de tesis ha sido realizado íntegramente en el Departamento de Farmacología Otto Orsingher, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET), de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Durante su ejecución, la autora fue becada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Para la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por: CONICET, la Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT-UNC) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT).

Se cumplimentó con los cursos requeridos y se realizaron actividades docentes en las asignaturas Anatomía, Fisiología y Fisiopatología Humana I y II (AFFH I y II) de la carrera de Farmacia y Fundamentos de Fisiología Vegetal y Animal de la carrera de Biotecnología, contando para ello con un cargo de Profesor Asistente (dedicación simple) obtenido por concurso y un cargo de Profesor Asistente (dedicación exclusiva) interino desde abril del 2022.

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme el espacio de formación desde mi carrera de grado hasta mi postgrado. Por darme la posibilidad de compartir mis conocimientos en el aula y poder aportar mi granito de arena a la comunidad de esta facultad.

A CONICET, SECyT y Agencia I+D+i por la financiación para desarrollar el trabajo de tesis.

Al departamento de Farmacología Otto Orsingher e IFEC por brindarme el espacio para mi crecimiento y formación. A cada uno de los investigadores que forman parte del departamento, por su trabajo incansable ante toda circunstancia.

A la comisión asesora Dra. Andrea Cragolini, Dr. Pablo Iribarren y Dr. Gabriel Cuadra por acompañarme en estos años y poner a disposición sus conocimientos y recursos para llevar adelante el proyecto de tesis. En cada reunión anual me hicieron sentir su respeto. A la evaluadora externa Dra. Maria José Bellini por ceder parte de su tiempo para evaluar la tesis.

A mi directora de tesis Dra. Teresa Scimonelli, Techí, gracias por abrirme las puertas de tu grupo, por la paciencia, por enseñarme a calmar mi espíritu y a avanzar sin prisa, pero sin pausa. En estos años nos pasaron todas, pero siempre fuiste para adelante, siendo para mí un ejemplo de fortaleza y compromiso.

Al equipo de investigadores del departamento, quienes han sido un ejemplo en mi formación y de todos recibí algún consejo. Gracias por la predisposición cada vez que necesité ayuda.

Al Dr. Gastón Calfa, por la paciencia, por las largas horas de charlas de espigas, memoria y deporte. Por ensañarme a cuestionar cada uno de mis experimentos y resultados.

A la Dra. Irene Martijena por sus consejos y por guiarme en muchas cuestiones administrativas.

Al equipo de técnicos Estela, Lorena y Leo, fueron fundamentales en lograr este objetivo, de cada uno aprendí un montón y hoy les debo lo que se hizo en la mesada. Gracias por tantas charlas de catarsis entre experimentos.

Al equipo del bioterio Yani, Javi y Nico por enseñarme con tanta paciencia la dinámica del trabajo dentro del bioterio y el cuidado de los animales.

A las secretarías Silvi y María José (Teacher) por estar atentas y tener todas las cuestiones burocráticas al día, fue (y es) una ayuda enorme.

A Gladys (Gladiola) por tantos cafecitos y tantas descongeladas del freezer.

Al equipo de AFFH de quienes aprendí a dictar clases, siempre dispuestos a trabajar en conjunto y coordinando los trabajos prácticos para poder realizar los experimentos y asistir a los congresos.

A Silvi Bustos, Dani y Eli las mejores compañeras de TP durante la pandemia, me hicieron divertirse y enseñaron mucho durante ese periodo.

A Martin Basmadjian, compañero de prácticas quien me ayudó desde mi llegada al departamento.

A Ivana, hermana científica que me recibió en el grupo y me acompañó en los primeros experimentos.

A Vane, amiga siempre presente sin importar la distancia ni la diferencia horaria, por tantas charlas y preguntas picantes. Feliz de recibir tu apoyo amiga.

A Luz, con quien compartí tantos años y construimos una amistad tan linda. Gracias por tantas catarsis, por compartir tantos momentos de felicidad y otros más difíciles. Te quiero un montón.

A Pauli Albrecht por compartir tantas horas de laboratorio y convencerme de llegar a la montaña.

A Lucía y Lean los más pequeños compañeros de escritorios, que me ponían al día con las novedades y escuchaban el minuto a minuto del avance de mi tesis.

A Ramiro, amigo gracias por estar en todo momento, por tanta ayuda, por escucharme, por compartir el consejo departamental y enseñarme como ser en el mundo de la gestión de la facultad.

A Leito, construimos una gran amistad que más allá de las diferencias ideológicas me enseñaste a ver que no todo es blanco o negro, a exponer las ideas en las actividades de gestión, me escuchaste con paciencia y mucho respeto.

A todo el grupo de becarios, con los que compartí desde mi llegada al departamento, los que se fueron sumando y los más nuevos, de todos siempre aprendí y sigo aprendiendo. Son un grupo de personas con una energía incansable y muy solidarios, hicieron que cada día de trabajo tenga un motivo para sonreír.

A mi grupo de entrenamiento, Runners Cba, del que formo parte desde el mismo comienzo de la tesis. Gracias por acompañarme en todo este camino, conocí a personas increíbles cada uno con una historia diferente y todos pensando en superarse día a día, fueron un ejemplo para mí.

A mi entrenador, Pablo Mana, quien confió en mí y me enseñó que siempre se puede un poquito más. Tu confianza me ayudó a superar cada desafío no sólo en lo deportivo.

A mis amigos, Los Huérfanos, Gabi, Jorgito, Dana, Mari y Koki los que me hicieron parte de un grupo de personas tan buenas, los primeros que escucharon el paso a paso de este gran proyecto, lograr hacer la tesis. Especialmente

agradecida con Danita, Mari y Koki por compartir todos los momentos, los mejores y los más críticos, siempre tan atentas y apoyándome en todo.

A Nati Tossollini, Vero Loyola, Fede Ogando y Tebi Mendez personas que llegaron a enseñarme a ser paciente, que siempre demostraron tener una gran confianza en mí y tenían los consejos justos en cada momento.

A mis amigos de siempre, los del comienzo, los que son mi ejemplo quienes además de ser grandes profesionales son sobre todo buenas personas. Siempre son motivo de risas y buenas juntadas que me llenan el alma de felicidad. Los quiero un montón Dani, Vane, Romi, Lobito, Crico, Nery, Charly, Juan Cruz, Juancito Bianco.

A mis abuelos, Lela y Lelo, mis abuelos que me enseñaron a darlo lo mejor de mí siempre y trabajar con honestidad. Anita y Coco, quienes me acompañan desde siempre están siempre atentos a que nada me falte y son mi mayor ejemplo de personas buenas y nobles. Bicho y Fany, gracias por confiar en mí.

A mis hermanos, Ro, Lucas y Belén, nada sería lo mismo sin ustedes. Nadie me conoce y me aguanta más que ustedes. Son indispensables en mi vida y un ejemplo de superación y luchadores por cumplir cada meta.

A mis padres, quienes me enseñan a seguir adelante a ir por lo difícil y no bajar los brazos. Quienes siempre trabajan en equipo por la familia y nos enseñaron más de una vez la resiliencia. Pilares fundamentales en mi crecimiento como persona, gracias por enseñarme a vivir con valores de responsabilidad, solidaridad y humanos.

Por último, y no menos importante, gracias a mí por entender que nada se consigue sin trabajo y que cada paso conseguido vale más cuando se hace en base a honestidad, disciplina y esfuerzo.

*Pero antes de empezar un viaje  
debemos pensar a dónde  
queremos llegar. Y, más importante,  
en quién nos queremos convertir.*

**A MI FAMILIA**

<b>ÍNDICE</b>	
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>DIETAS RICAS EN GRASAS Y NEUROINFLAMACIÓN</b> .....	<b>23</b>
Efectos de DRG sobre memorias dependientes de hipocampo .....	26
<b>APRENDIZAJE Y MEMORIA</b> .....	<b>28</b>
Condicionamiento de miedo contextual .....	29
Estructura del hipocampo y su participación en la formación de una memoria de miedo contextual .....	31
Plasticidad sináptica .....	32
<b>MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS DE DRG SOBRE PROCESOS DE MEMORIA</b> .....	<b>34</b>
<b>SISTEMA MELANOCORTINÉRGICO</b> .....	<b>40</b>
Mecanismos de acción de $\alpha$ -MSH .....	43
Efecto antiinflamatorio y antioxidante de $\alpha$ -MSH .....	44
Efecto neuroprotector de $\alpha$ -MSH .....	46
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>51</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>52</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>53</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
<b>ANIMALES</b> .....	<b>55</b>
<b>DIETA</b> .....	<b>56</b>
<b>CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA</b> .....	<b>56</b>
<b>INYECCIÓN INTRAHIPOCAMPAL</b> .....	<b>57</b>
<b>DROGAS: ADMINISTRACIÓN Y DOSIS</b> .....	<b>58</b>
<b>DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PERIFÉRICOS</b> .....	<b>59</b>
<b>ANÁLISIS HISTOLÓGICO</b> .....	<b>60</b>
<b>CONDICIONAMIENTO DE MIEDO CONTEXTUAL</b> .....	<b>61</b>
Aparato de condicionamiento de miedo .....	61
Sesión de entrenamiento .....	61
Sesión de test.....	62
Evaluación del miedo condicionado .....	62
<b>DISECCIÓN</b> .....	<b>62</b>
<b>DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES INDIRECTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	<b>63</b>

Preparación del homogenato de hipocampo dorsal .....	63
Cuantificación de productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP) .....	63
Cuantificación del producto derivado de la oxidación lipídica, malondialdehído (MDA) .....	64
<b>PERFUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
Preparación de las muestras para evaluación de plasticidad sináptica estructural .....	64
<b>ANÁLISIS DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA ESTRUCTURAL.....</b>	<b>65</b>
Preparación de las muestras para evaluación de reactividad y proliferación de astrocitos .....	66
<b>ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD Y PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS</b>	
<b>INMUNOFLOURESCENCIA .....</b>	<b>67</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>69</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO I: Déficit cognitivo inducido por una DRG asociada a un estímulo inmune. Rol modulador de <math>\alpha</math>-MSH .....</b>	<b>71</b>
Ia. Efecto del consumo de una DRG sobre la variación del peso y los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos. ....	72
Ib. Efecto de $\alpha$ -MSH sobre la consolidación de una memoria de miedo contextual en animales que consumieron DRG durante cinco días y recibieron un estímulo inmune débil. ....	74
<b>CAPÍTULO II: Efecto de <math>\alpha</math>-MSH sobre cambios en la plasticidad estructural del hipocampo dorsal durante el proceso de consolidación de una memoria contextual de miedo, en animales expuestos a DRG más un estímulo inmune débil .....</b>	<b>77</b>
IIa. Efecto de $\alpha$ -MSH sobre cambios en la densidad total de espinas dendríticas en hipocampo dorsal inducidos por el consumo de una DRG asociada a un estímulo inmune débil. ....	78
IIb. Efecto de $\alpha$ -MSH sobre cambios en la densidad de espinas finas y maduras en hipocampo dorsal inducidos por el consumo de una DRG asociada a un estímulo inmune débil. ....	81
<b>CAPÍTULO III: Efecto de <math>\alpha</math>-MSH sobre el estrés oxidativo en animales que recibieron una DRG durante cinco días más un estímulo inmune débil .....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO IV: Efecto de <math>\alpha</math>-MSH sobre la reactividad de astrocitos hipocampales en animales que recibieron una DRG durante cinco días más un estímulo inmune débil .....</b>	<b>88</b>
<b>CAPÍTULO V: Eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH en el déficit cognitivo asociado al consumo de DRG .....</b>	<b>92</b>
Va. Determinación de la capacidad de las NP para llegar a hipocampo dorsal, región CA1. ....	93
Vb. Eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH en el déficit cognitivo asociado al consumo de DRG por un periodo corto de tiempo (5 días) más un estímulo inmune débil. ....	94

<b>CAPÍTULO VI: Eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH en el déficit cognitivo asociado al consumo de DRG por un periodo prolongado (8 semanas) .....</b>	<b>98</b>
<b>Via. Impacto del consumo de DRG sobre la variación del peso.....</b>	<b>99</b>
<b>Vib. Eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH sobre el deterioro cognitivo asociado al consumo de DRG durante 8 semanas.....</b>	<b>100</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>120</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>140</b>

## **ABREVIATURAS**

$\alpha$ 7nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

AgRP: Proteína relacionada al gen agouti

AGS: Ácidos grasos saturados libres

AMPA: Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de la varianza

AOPP: Producto final de la oxidación proteica

AP: Ácido palmítico

ASIP: Proteína de señalización agouti

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE: Barrera hematoencefálica

CA: Cuerno de amonias

CaMKII: Calcio/calmodulina quinasa II

CMC: Condicionamiento de miedo contextual

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

DC: Dieta Control

DRG: Dieta ricas en grasas saturadas

EA: Enfermedad de Alzheimer

EC: Estímulo condicionado

EI: Estímulo incondicionado

EN: Estímulo neutro

ERK: Proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares

ERO: Especies reactivas de oxígeno

GD: Giro dentado

GFAP: Proteínas de filamento intermedio

HD: Hipocampo dorsal

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta

IL-1R1: Receptor IL-1 tipo 1

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal

LPS: Lipopolisacáridos

LTP: Potenciación a largo plazo

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

MC: Melanocortinas

MCP: Memoria de corto plazo

MCP1: Proteína quimiotáctica 1 de monocitos y macrófagos

MCR: Receptor melanocortinérgico

MDA: Malondialdehido

MLP: Memoria de largo plazo

NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B

NMDA: N-metil-D-aspartato

NOS: Óxido nítrico sintasa

NPc: Nanopartículas cargadas

NPv: Nanopartículas vacías

ON: Óxido nítrico

PGE2: Prostaglandina E2

PKA: Proteína quinasa A

POMC: Proopiomelanocortina

PSD 95: Proteína de densidad postsináptica 95

RC: Respuesta condicionada

SI: Sistema inmune

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

TA: Temperatura ambiente

TG: Tracto gastrointestinal

TLR4: Receptores tipo Toll 4

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

Zif268: Factor de transcripción dedos de zinc

$\alpha$ -MSH: Hormona alfa melanocito estimulante

$\gamma$ -GSH:  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa

# RESUMEN



El consumo de alimentos con alto contenido de grasas saturadas conduce a una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad. En Argentina más del 60% de la población adulta tiene exceso de peso, en una proporción de 36.3% de personas con sobrepeso y 25,3% con obesidad. Las dietas ricas en grasas saturadas (DRG) no sólo generan alteraciones metabólicas importantes, sino que pueden afectar al sistema nervioso central (SNC).

Los resultados expuestos en el presente trabajo de tesis sustentan la hipótesis inicial en la cual se plantea que el consumo de una DRG, aún por periodos cortos de tiempo, sensibilizará al sistema inmunológico, el cual ante un estímulo débil responderá de manera exacerbada y se producirá neuroinflamación. Este contexto tiene un impacto negativo debido al incremento de mediadores inflamatorios y oxidativos que afectan la función cerebral. Una de las áreas más vulnerable es el hipocampo, por lo que se afectan procesos cognitivos. Por otra parte,  $\alpha$ -MSH mediante su acción antiinflamatoria y neuroprotectora, podrá revertir los efectos de la neuroinflamación inducida por la ingesta de una DRG.

El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto del consumo de una DRG sobre la consolidación de una memoria de miedo contextual, dependiente de hipocampo, estableciendo los posibles mecanismos involucrados, así como el posible rol modulador de  $\alpha$ -MSH.

Los resultados obtenidos demostraron que el consumo de una DRG durante un período corto (cinco días), asociada a un desafío inmune débil (LPS, en una dosis baja), disminuyó la expresión de la memoria de miedo contextual. Con el fin de dilucidar los mecanismos subyacentes que inducen el deterioro cognitivo, se determinaron los efectos del consumo de la DRG más el desafío inmune en la plasticidad sináptica estructural, en el estado de estrés oxidativo y la reactividad de los astrocitos.

En cuanto a los cambios en la plasticidad estructural de neuronas piramidales de hipocampo, se demostró que el deterioro cognitivo está relacionado con la disminución de la densidad total de espinas dendríticas a expensas de la disminución de espinas maduras y finas.

El aumento de los mediadores inflamatorios en el SNC favorece el desbalance entre las reacciones oxidantes y antioxidantes, lo que lleva al incremento del estrés oxidativo. Los resultados obtenidos demostraron que la asociación entre DRG-LPS aumentó biomarcadores indirectos de estrés oxidativo, lo que también sugiere la activación de una respuesta neuroinflamatoria.

Los astrocitos participan de la resolución de los procesos inflamatorios, tienen la capacidad de polarizarse a un estado de astrogliosis reactiva y en consecuencia experimentan cambios en la expresión de genes y en su morfología. La DRG asociada a LPS aumentó la proliferación de los astrocitos y la intensidad de GFAP en hipocampo, ambos marcadores indicativos de la polarización al estado de astrogliosis reactiva.

Por otra parte, las melanocortinas, y principalmente  $\alpha$ -MSH, ejercen potentes acciones antiinflamatorias en el SNC. En este estudio se determinó que la inyección de  $\alpha$ -MSH en hipocampo dorsal revirtió la disminución de la expresión de la memoria de miedo contextual inducida por la ingesta de la DRG más el desafío inmune con LPS. Asimismo, se demostró que  $\alpha$ -MSH también fue capaz de modificar la disminución de la densidad total de espinas, a expensas del aumento de ambos tipos de espinas, maduras y finas. También se determinó que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH fue capaz de disminuir los biomarcadores de estrés oxidativos que fueron elevados por el consumo de DRG asociado a LPS. Estos resultados sugieren que  $\alpha$ -MSH podría estar ejerciendo su capacidad antioxidante a través de la activación de los MC4R expresados en los astrocitos. Sin embargo, no se observaron efectos significativos de  $\alpha$ -MSH respecto a la reactividad astrocitaria.

Los sistemas nanoparticulados pueden ser utilizados para atravesar la barrera hematoencefálica y mejorar la biodisponibilidad de fármacos en el tejido cerebral. Utilizamos un tratamiento con nanopartículas con NDP- $\alpha$ -MSH (análogo de  $\alpha$ -MSH) para revertir la disminución en la expresión de la memoria de miedo contextual ocasionada por el consumo de una DRG, en el modelo experimental ya descrito y en animales alimentados con una DRG durante 8 semanas.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con nanopartículas con NDP- $\alpha$ -MSH revirtió la disminución en la expresión de la memoria de miedo contextual ocasionado por el consumo de DRG, en ambos modelos experimentales de ingesta de la dieta. Estos hallazgos prueban la eficacia del empleo de la nanoterapia, la cual demostró favorecer la llegada del NDP- $\alpha$ -MSH al hipocampo sin modificar su afinidad por su receptor MC4.

Los resultados descritos demostraron la acción neuroprotectora de  $\alpha$ -MSH en un modelo de neuroinflamación inducido por el consumo de DRG, ya que fue capaz de revertir la disminución de la expresión de la memoria de miedo contextual. Este efecto neuroprotector se evidenció en la plasticidad sináptica estructural, el estrés oxidativo y posiblemente modulando la reactividad astrocitaria.

El uso de la nanoterapia demostró ser eficiente para revertir el deterioro cognitivo y plantea el potencial desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

# ABSTRACT



The consumption of high saturated fat food leads to a high prevalence of overweight and obesity. In Argentina, more than 60% of the adult population is overweight, with 36.3% of people being overweight and 25.3% being obese. Diets rich in saturated fats not only generate significant metabolic alterations but can also affect the central nervous system (CNS).

The results presented in this thesis support the initial hypothesis that the consumption of high fat diet (HFD), even for short periods, can sensitize the immune system, which respond in an exacerbated manner to a weak stimulus, leading to neuroinflammation. This context has a negative impact due to the increase in inflammatory and oxidative mediators that affect brain function. One of the most vulnerable areas is the hippocampus, where cognitive processes can be affected. On the other hand,  $\alpha$ -MSH, through its anti-inflammatory and neuroprotective action, could reverse the effects of neuroinflammation induced by the intake of a HFD.

The objective of this thesis was to evaluate the effect of consuming a HFD on the consolidation of contextual fear memory, dependent on the hippocampus, establishing possible mechanisms involved, as well as the possible modulating role of  $\alpha$ -MSH.

The results obtained showed that the consumption of HFD for a short period (five days), associated with a weak immune challenge (LPS, at a low dose), decreases the expression of contextual fear memory. In order to elucidate the underlying mechanisms, the effects on structural synaptic plasticity, oxidative stress status, and astrocyte reactivity were determined.

Regarding changes in the structural plasticity of hippocampal pyramidal neurons, it was demonstrated that cognitive impairment is associated with a decrease in the total density of dendritic spines related to a decrease in mature and thin spines.

The increase in inflammatory mediators favors the imbalance between oxidant and antioxidant reactions, leading to an increase in oxidative stress. The results obtained demonstrate that the association between the HFD and LPS increases indirect biomarkers of oxidative stress, which also suggests the activation of a neuroinflammatory response.

Astrocytes participate in the resolution of inflammatory processes; they can polarize to a reactive astrogliosis state and, consequently, experience changes in gene expression and morphology. The HFD associated with LPS increased astrocyte proliferation and GFAP intensity, both indicative markers of polarization to the reactive astrogliosis state.

On the other hand, melanocortins, and mainly  $\alpha$ -MSH, exert potent anti-inflammatory actions in the CNS. In this study, it was determined that the injection of  $\alpha$ -MSH in the dorsal hippocampus reversed the decrease in contextual fear memory expression induced by the consumption of HFD plus the immune challenge with LPS. Likewise, it was demonstrated that  $\alpha$ -MSH was able to modify the decrease in the total density of spines at the expense of an increase in both types of spines, mature and thin. Treatment with  $\alpha$ -MSH was able to decrease the oxidative stress biomarkers that were elevated by the consumption of the HFD associated with LPS. These results suggest that  $\alpha$ -MSH could be exerting its antioxidant capacity through the activation of MC4R expressed in astrocytes. However, no significant effects of  $\alpha$ -MSH were observed regarding astrocyte reactivity.

The nanoparticle systems can be used to cross the blood-brain barrier and improve the bioavailability of drugs in brain tissue. We used a treatment with nanoparticles containing NDP- $\alpha$ -MSH (an analog of  $\alpha$ -MSH) to reverse the decrease in contextual fear memory expression caused by the consumption of HFD in the experimental model described and in animals fed with a HFD for 8 weeks.

Our results demonstrated that treatment with nanoparticles containing NDP- $\alpha$ -MSH reversed the decrease in contextual fear memory expression caused by HFD consumption in both experimental diet intake models. These findings demonstrate the efficacy of nanotherapy, which was shown to favor the arrival of NDP- $\alpha$ -MSH to the hippocampus without modifying its affinity for its MC4 receptor.

The described results demonstrated the neuroprotective action of  $\alpha$ -MSH in a model of neuroinflammation induced by HFD consumption, as it was able to reverse the decrease in the expression of contextual fear memory. This

neuroprotective effect was evidenced in structural synaptic plasticity, oxidative stress and possibly modulating astrocyte reactivity.

The use of nanotherapy proved to be efficient in reversing cognitive impairment and raises the potential development of new therapeutic strategies.

# INTRODUCCIÓN



El consumo de dietas con alto contenido calórico está en aumento en las últimas décadas, produciendo en la población mundial un incremento de personas con sobrepeso y obesidad, lo que supone un desafío al sistema de salud ya que esta condición representa entre el 2 y el 10% del gasto nacional en salud. El último reporte realizado por la World Obesity Federation muestra que en Argentina más del 60% de la población adulta tiene exceso de peso, en una proporción de 36.3% de personas con sobrepeso y 25,3% con obesidad. Además, muestran una proyección para 2030 con un incremento del porcentaje de personas con obesidad que llegaría al 35.8% (4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Dirección Nacional de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades Crónicas No Transmisibles., 2019; Barata Cavalcanti y col., 2022).

Las personas que presentan sobrepeso y obesidad tienen mayor riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas no transmisibles como afecciones cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, algunos cánceres, depresión y patologías neurodegenerativas (García-García y col., 2022; Kolotkin y col., 2001)

El hábito alimenticio de gran parte de la población occidental está basado en dietas con alto contenido en azúcares refinados y/o ricas en grasas saturadas (DRG). Este desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético diario llevan a un acúmulo anormal o excesivo de tejido adiposo, el cual es metabólicamente activo y tiene efectos sobre la homeostasis del organismo.

El aumento de las células adiposas y su gran actividad metabólica estimula la quimiotaxis de macrófagos, los cuales polarizan desde su estado M2 (antiinflamatorio) al estado M1 (proinflamatorio), llevando a un incremento en la expresión de mediadores inflamatorios y al reclutamiento de monocitos (Martínez Leo y col., 2021).

El incremento de las células adiposas favorece el aumento de ácidos grasos saturados libres (AGS) en circulación. Varios estudios han demostrado que los AGS son agonistas de los receptores tipo Toll 4 (toll-like receptor 4, TLR4), los cuales son capaces de activar el factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y consecuentemente aumentar los niveles de citoquinas proinflamatorias (interleucina 1 beta, IL-1 $\beta$ ; interleucina 6, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa, TNF- $\alpha$ ) (Van Dyken y Lacoste, 2018). Sin embargo, otros estudios proponen que

los AGS no actúan de manera directa sobre los TLR4, sino que estos últimos necesitan ser activados mediante la acción de macrófagos M1, polarizados a este estado por acción de AGS (Lancaster y col., 2018; Parimisetty y col., 2016).

Por otra parte, las células adiposas son capaces de secretar factores biológicamente activos llamados adipoquinas o adipocitoquinas; entre ellos se encuentran: leptina, adipoleptina, apelina, resistina, proteína quimiotáctica 1 de monocitos y macrófagos (MCP1), además, pueden secretar IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  los cuales tienen efectos proinflamatorios dentro del contexto de sobrepeso y obesidad, generando de esta manera un estado crónico de inflamación leve (Hajer y col., 2008; Reyes-Farias y col., 2021; Wang y col., 2008).

El consumo de DRG también se ha asociado a la disfunción mitocondrial, con lo cual hay un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) aumentando así el estado de estrés oxidativo (Lasker y col., 2019; Matsuzawa-Nagata y col., 2008; Prem y Kurian, 2021).

Otra consecuencia del consumo de DRG, es el aumento de lipopolisacáridos (LPS), los cuales están presentes en la membrana celular de bacterias *gram-negativas*. Se ha postulado que el ingreso de LPS al organismo es debido a la disbiosis en la microbiota intestinal, ya que las DRG favorecen, entre otros efectos, la proliferación de las bacterias del tipo Firmicutes, las cuales degradan el mucus intestinal, y disminuyen las bacterias del tipo Bacteroidetes, implicadas en la expresión de proteínas de unión estrecha que atenúan la permeabilidad intestinal. Esta disbiosis causa endotoxemia que estimula la activación del sistema inmune (Bruce-Keller y col., 2015; Yang y col., 2020).

## DIETAS RICAS EN GRASAS Y NEUROINFLAMACIÓN

Los efectos a nivel periférico asociados al consumo de DRG tienen consecuencias en el sistema nervioso central (SNC).

Como se mencionó anteriormente el aumento de las células adiposas y su gran actividad metabólica produce un incremento en la expresión de mediadores inflamatorios y en consecuencia aumentan sus niveles en el sistema vascular **(Fig. 1)**.

Por otra parte, está ampliamente demostrado que existe una comunicación bidireccional entre el SNC y el tracto gastrointestinal (TG). La ingesta de DRG induce un desequilibrio en la microbiota intestinal favoreciendo el aumento en la permeabilidad de la barrera intestinal lo que facilita el paso de bacterias Gram-negativas **(Fig. 1)**. En este contexto también se observó la activación de células dendríticas residente del intestino, las cuales están implicadas en la regulación de la respuesta del sistema inmune (SI). Estos efectos llevan a un aumento de citoquinas proinflamatorias en la circulación sistémica. El aumento de los mediadores inflamatorios en el torrente sanguíneo puede llegar al SNC, ya que algunas de las citoquinas inflamatorias pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) al unirse a sus receptores y activar el mecanismo de transcitosis. Además, pueden ingresar al SNC a través de la interacción con los órganos circunventriculares, los cuales están desprovistos de la BHE (Ratsika y col., 2023; Van Giau y col., 2018).

Se ha establecido que el consumo de DRG es capaz de afectar la integridad de la BHE. Uno de los efectos observados es la disminución de las proteínas que forman las uniones estrechas entre las células endoteliales que forman la BHE (occludina, occludin 5, occludin 12 y proteína occludin de la zona citoplasmática zo-1 y zo-2) favoreciendo el ingreso de agentes patógenos y/o mediadores inflamatorios al SNC (Buie y col, 2019; Davidson y col., 2012; Kanoski y Davidson, 2011). Asimismo, los mediadores inflamatorios elevados de manera constante en la circulación tienen la capacidad de cruzar y/o de interactuar con las células de la BHE induciendo un aumento en la permeabilidad (Parimisetty y col., 2016)

Estudios clínicos y preclínicos demuestran que en pacientes obesos existe un incremento de IL-6. Esta citoquina inhibe la expresión de óxido nítrico endotelial y en consecuencia se produce un daño en la integridad de las células endoteliales de la BHE. Sumado a este efecto, el aumento de TNF- $\alpha$  también favorece al desarrollo de la permeabilidad de la BHE (Buie y col., 2019; O'Brien y col., 2017).

IL-1 $\beta$  es una de las principales citocinas proinflamatorias que se encuentra elevada durante procesos inflamatorios (Gabay y col., 2010). IL-1 $\beta$  en circulación sistémica puede actuar sobre el SNC mediante diferentes vías (Banks y col., 1995)

Las células endoteliales que forman la BHE expresan en la superficie celular gran cantidad del receptor IL-1 tipo 1 (IL-1R1), el cual está asociado a la proteína accesoria IL-1RacP. La unión de este complejo con IL-1 $\beta$  inicia una cascada de reacciones que inducen la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y movilización de NF- $\kappa$ B, que estimula la transcripción de genes proinflamatorios (Hauptmann y col., 2020; Weber y col., 2010).

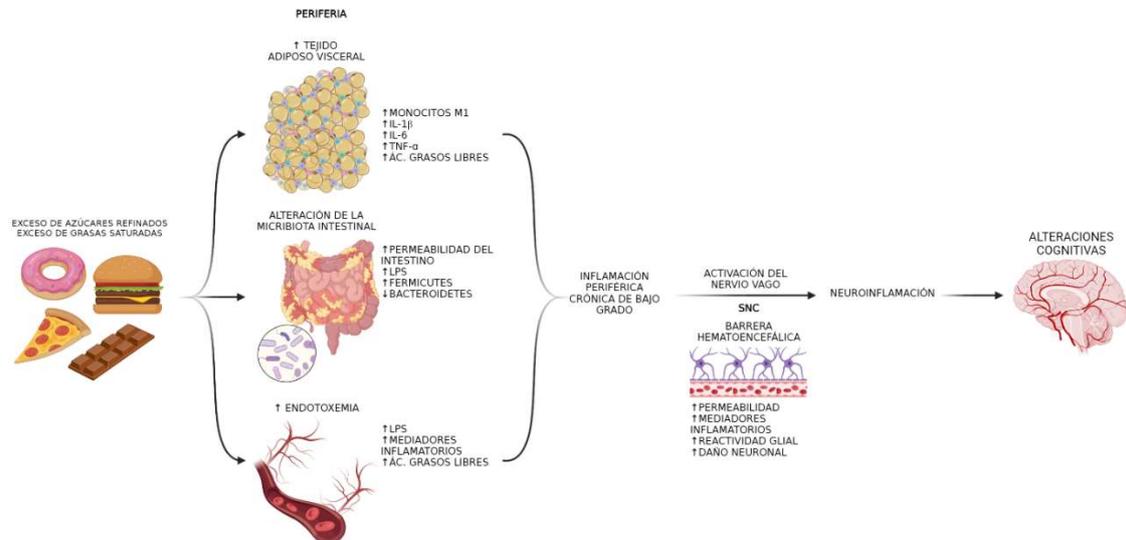
Por otra parte, en el SNC, IL-1 $\beta$  es sintetizada por diferentes tipos de células, principalmente por la microglía y astrocitos, y en menor medida por neuronas, como respuesta a un trauma o a la presencia de patógenos (Lee y Suk, 2017; Mendiola y Cardona, 2018), como también en eventos estresantes o durante el envejecimiento (Jones y col., 2018). Ejerce su efecto a través de la unión con su receptor IL-1R1 (Dinarello, 2009), el cual se encuentra en la membrana celular de neuronas, en varias estructuras del cerebro, pero predomina en neuronas granulares y piramidales del hipocampo (Ilyin y Plata-Salamán, 1996; Parnet y col., 2002).

Otra de las citoquinas que se encuentran aumentadas en el contexto neuroinflamatorio es TNF- $\alpha$ . La cual estimula la activación de las células gliales, y se produce un ciclo de retroalimentación positiva con lo cual hay mayor liberación de la citoquina desde estas células (Benveniste y col., 1995; Jiang y col., 2021).

Otra vía de comunicación implicada en las consecuencias del consumo de DRG sobre el SNC es la vía neural (**Fig. 1**). Mediante la activación de la vía aferente del nervio vago, se produce una comunicación rápida del SI y el cerebro, ya que no requiere del pasaje a través de la BHE, llevando la información al SNC para que este regule las respuestas inflamatoria e inmune (Benarroch, 2019; Olsthoorn y col., 2021; Zhang y col., 2022).

El aumento de citoquinas afecta a diferentes áreas del SNC siendo una de las más vulnerables el hipocampo (Parimisetty y col., 2016), ocasionando de esta manera un deterioro cognitivo (**Fig. 1**) (Leigh y Morris, 2020; Sobesky y col., 2014). El hipocampo cumple un rol crucial en la formación de la memoria declarativa, tanto en humanos como en roedores, la cual implica la recuperación consciente de la información relacionada con lugares (memoria espacial o contextual), objetos y eventos (Eichenbaum, 2000; Wallenstein y col., 1998).

Se demostró que el consumo de DRG, aún por un período corto, es capaz de sensibilizar al SI ante un estímulo, ya sea inmune o ante un evento relevante de estrés. Esta sensibilización del SI se observa aún antes de desarrollarse cambios asociados a desordenes metabólicos y obesidad. Diferentes estudios han demostrado que el consumo de DRG durante tres días asociado a un desafío inmune débil, mediante la inyección intraperitoneal de una dosis baja de LPS o la administración oral de la bacteria *Listeria monocitogenes* fueron capaces de generar una respuesta exacerbada del SI. Se han establecido los posibles mecanismos por los cuales se produce esta respuesta, los cuales llevan al incremento de la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-6 y en la inhibición del receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ( $\alpha 7nAChR$ ), el cual atenúa la respuesta inflamatoria y la liberación de citoquinas en la periferia y en el SNC. Por otra parte, observaron que los procesos cognitivos dependientes de hipocampo también fueron susceptibles a esta respuesta exacerbada (Heras y col., 2019; Sobesky y col., 2016; Souza y col., 2019).



**Figura 1- Esquema ilustrativo de los efectos del consumo de dietas altas en azúcares refinados y grasas saturadas.** Se producen alteraciones periféricas como un exceso del depósito de células adiposas, modificación en la microbiota intestinal (disbiosis), presencia de endotoxemia, activación inmune del nervio vago. Estas alteraciones en conjunto llevan a un estado inflamatorio crónico de bajo grado el cual mediante diferentes vías de comunicación afecta al SNC produciendo desequilibrios en la homeostasis y alteraciones cognitivas. Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### Efectos de DRG sobre memorias dependientes de hipocampo

El consumo de DRG, además de estar asociado al desarrollo de desórdenes metabólicos, puede contribuir a la aparición temprana de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, depresión o disfunción cognitiva. Diferentes reportes han establecido la asociación entre la obesidad y alteraciones en los procesos cognitivos, especialmente los dependientes de hipocampo, tanto en humanos como en roedores (Francis y Stevenson, 2011; Kanoski y Davidson, 2011; Leigh Gibson y col., 2013).

Diversos estudios asociaron el consumo de dietas ricas en grasas saturadas con un pobre desempeño en diversos *test* de memoria: laberinto acuático de Morris, *test* de reconocimiento de objetos, memoria contextual de miedo, entre otros, los

cuales dependen principalmente de hipocampo. Se han utilizado una gran diversidad de modelos animales: diferentes cepas y especies de roedores, tiempo de consumo y composición de la dieta.

Las evidencias que asocian el consumo de DRG con déficit en memorias dependiente de hipocampo han sido observadas en su mayoría en modelos de ingesta por periodos prolongados de tiempo (Kanoski y Davidson, 2011; Lama y col., 2021). Además, hay algunas evidencias de los efectos de la exposición a las DRG con protocolos de corta duración. También en estos modelos, hay gran diversidad en el tiempo de ingesta (desde 3 días hasta 7 días), en la composición de la dieta (% de calorías proveniente de las grasas) y de la edad de los animales de experimentación. Podemos mencionar el trabajo de Spencer y col., quienes observaron que animales envejecidos alimentados con DRG durante tres días mostraron un deterioro en el *test* de memoria de miedo contextual a largo plazo, efecto que no fue observado en la memoria a corto plazo ni en animales jóvenes (Spencer y col., 2017). Otra publicación demostró un detrimento en memorias dependiente de hipocampo en un modelo de 7 días de ingesta de DRG. Se examinó diariamente este deterioro y en el tercer día de ingesta ya se manifestaba esta deficiencia en el *test* de memoria contextual. Por otro lado, evaluaron la conducta de depresión mediante el *test* de suspensión de la cola, la cual se manifestó luego del quinto día (de Paula y col., 2021). Consistente con estos reportes, Khazen y col. demostraron que ratones jóvenes (21 días de edad) alimentados durante 7 días con DRG, tuvieron un pobre desempeño en el *test* de memoria de localización de objeto, el cual depende de hipocampo. Al evaluar locomoción y la ansiedad no observaron efectos del consumo de la DRG por un período corto de tiempo (Khazen y col., 2019).

Estos antecedentes, sumados al interés creciente en los últimos años de los efectos del consumo de DRG sobre los procesos cognitivos incentivaron a la realización de meta-análisis, los cuales concluyen que los *test* más vulnerables son aquellos que implican memorias contextuales, siendo hipocampo la estructura cerebral clave para la formación de estas memorias (Abbott y col., 2019; Olsthoorn y col., 2021).

## APRENDIZAJE Y MEMORIA

Los seres humanos, al igual que otras especies, tenemos la capacidad de recibir, codificar y almacenar información que percibimos a partir de diferentes estímulos. Esto es de gran relevancia ya que permite el almacenamiento de información, importante para la supervivencia de las especies.

Un individuo expuesto a una experiencia novedosa es capaz de adquirir la información mediante el proceso definido como aprendizaje, mientras que los cambios internos espacio-temporales en circuitos neuronales que perduran en el tiempo son definidos como la memoria (Abel y Lattal, 2001; Eichenbaum, 2003; Kandel, 2001).

En una primera instancia estos cambios internos permiten mantener la información durante algunos minutos u horas y se encuentran en una forma inestable (memoria de corto plazo, MCP); para que persistan en el tiempo debe ocurrir el proceso de consolidación de la memoria. La consolidación es una etapa dinámica dependiente de cambios en la transcripción de genes, en la expresión de proteínas y cambios a nivel de la plasticidad neuronal, todos ellos limitados temporalmente (Cowan y col., 2021; Goto, 2022; Takehara-Nishiuchi, 2021). De esta manera la información almacenada forma una nueva traza de memoria que persiste en el tiempo (memoria de largo plazo, MLP).

Esta nueva traza de memoria almacenada puede ser evocada de manera consciente o inconsciente, y dependiendo de diferentes características como la edad y la fuerza de la memoria y la duración de las sesiones de reactivación, se puede inducir a una etapa de labilización la cual involucra modificaciones dinámicas que pueden iniciar dos procesos: la reconsolidación o la extinción de la memoria (Dudai, 2002). Ambos procesos requieren de cambios bioquímicos y estructurales y están delimitados temporalmente (**Fig. 2**) (Bellfy y Kwapis, 2020; Liu y col., 2019). Todas las etapas mencionadas (consolidación, evocación, reconsolidación y extinción) difieren entre sí en los sustratos bioquímicos y las conexiones entre las áreas cerebrales involucradas (Barnes y col., 2012; Lee y col., 2004; McKenzie y Eichenbaum, 2011).



**Figura 2- Etapas del procesamiento y almacenamiento de la información.**

Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

Se han establecido diferentes tipos de memorias las cuales implican la recuperación consciente o inconsciente de la información, y se denominan memoria declarativa o explícita y memoria de procedimiento o implícita, respectivamente. La participación de diferentes estructuras cerebrales es responsable de la formación de los distintos tipos de memoria.

Dentro de la memoria declarativa el hipocampo está implicado en la consolidación de una memoria asociada a un contexto y a un estímulo, denominada memoria asociativa (Eichenbaum, 2000; Morgado-Bernal, 2011; Wallenstein y col., 1998).

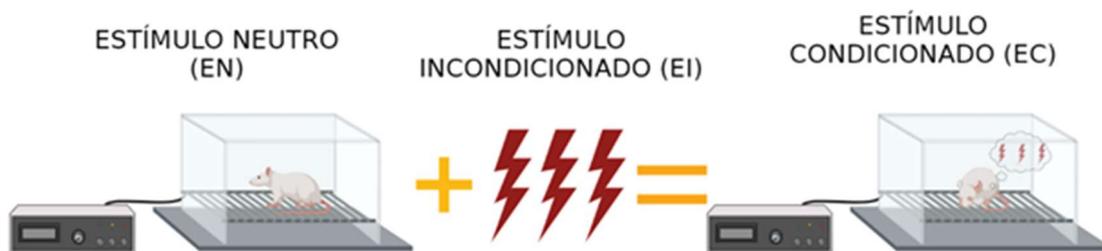
En roedores, la memoria asociativa entre un contexto y un estímulo lleva a cambios conductuales que se expresan en el comportamiento del individuo y constituyen el principio básico del condicionamiento. Esto ha permitido el estudio de la memoria mediante la observación de la conducta en sujetos expuestos al condicionamiento clásico o pavloviano (Quillfeldt, 2015).

### **Condicionamiento de miedo contextual**

El condicionamiento de miedo contextual (CMC) se ha observado desde diferentes grupos de invertebrados hasta los mamíferos, incluidos los humanos. El CMC es el paradigma experimental más usado para el estudio de la memoria y de las adaptaciones fisiológicas y comportamentales que la subyacen.

Este paradigma consiste en la exposición del individuo a un estímulo neutro (EN) el cual posteriormente va a ser apareado a un estímulo aversivo incondicionado

(EI) de relevancia biológica. De este modo, el contexto del EN pasa a tener valor emocional convirtiéndose en un estímulo condicionado (EC). La futura exposición del individuo al EC predice la ocurrencia del EI y en consecuencia se produce una respuesta condicionada (RC) (**Fig. 3**). En roedores se utiliza como índice de la RC de miedo la conducta de congelamiento, definida como la inmovilidad total del animal acompañada sólo por los movimientos necesarios para respirar (Maren, 2001).



**Figura 3- Componentes del condicionamiento de miedo clásico.** Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

Durante el procesamiento de la memoria de miedo contextual está implicado el sistema límbico, formado por diferentes estructuras cerebrales subcorticales. Estas estructuras son: corteza media prefrontal, amígdala e hipocampo, las cuales están interconectadas. La amígdala recibe aferencias de la corteza con información somatosensorial y del hipocampo con información de representación contextual. Estos estímulos recibidos son integrados, y en consecuencia se genera una respuesta de miedo (Fanselow, 1998; Janak y Tye, 2015; Johansen y col., 2011; Ledoux, 1996; LeDoux, 2007; Ledoux, 2000).

Para abordar los objetivos de este trabajo de tesis vamos a emplear el paradigma del CMC y evaluar los cambios que subyacen a la formación de esta memoria en hipocampo, bajo las condiciones de nuestro modelo experimental.

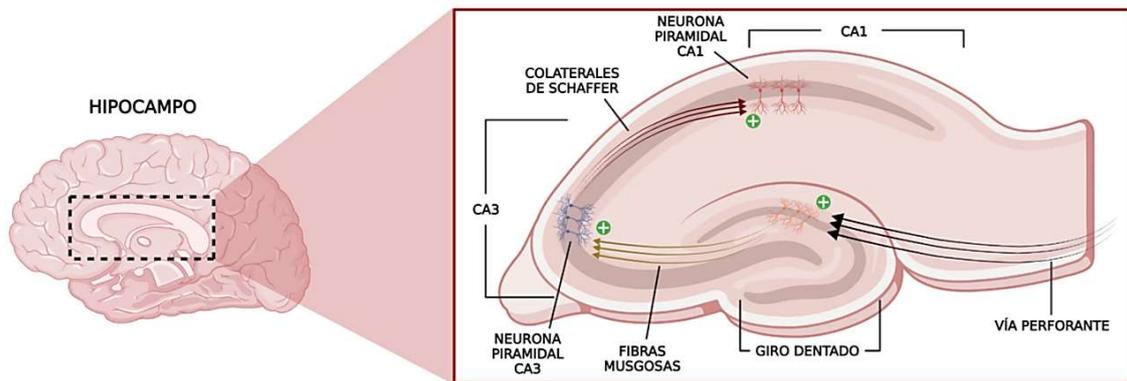
## **Estructura del hipocampo y su participación en la formación de una memoria de miedo contextual**

Como fue mencionado anteriormente, el hipocampo participa en la formación de la memoria de miedo contextual ya que cumple un rol fundamental en la integración de múltiples claves del contexto y genera una representación unificada. Luego, esta información es transmitida hacia amígdala donde adquiere una relevancia emocional, estableciéndose así, una asociación entre el contexto y el estímulo aversivo (Anagnostaras y col., 2001; Eichenbaum y col., 1996; Fanselow y Poulos, 2005; Ledoux, 2000; Maren y col., 2013).

El hipocampo se encuentra en la porción medial del lóbulo temporal y está formado por el hipocampo propiamente dicho, el giro dentado (GD) y el complejo subicular. Estas áreas están conectadas entre sí fundamentalmente por conexiones excitatorias glutamatérgicas.

La información llega al hipocampo mediante la vía excitatoria perforante, ingresa a GD desde la corteza entorrinal, con información proveniente desde áreas corticales o subcorticales. GD está conformado por células granulares las cuales reciben esta información para luego transmitirlas al hipocampo propiamente dicho.

El hipocampo propiamente dicho está constituido por neuronas piramidales ubicadas en una capa única, densamente empaquetadas, llamada Cuerno de Ammonis (CA) que a su vez se divide en las regiones: CA1, CA2 y CA3. La información proveniente de GD lo hace a través de las vías de las fibras musgosas hacia el área CA3. Posteriormente, las neuronas de CA3 por intermedio de la vía de las colaterales de Schaffer proyectan la información hasta CA1. Por último, la información proveniente de neuronas piramidales de CA1 retorna a estructuras corticales y subcorticales (**Fig. 4**) (Neves y col., 2008).



**Figura 4- Esquema de la estructura básica de hipocampo de un roedor. Representación de los circuitos excitatorios principales.** Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### Plasticidad sináptica

Durante el proceso de recepción y almacenamiento de la información el SNC experimenta cambios en los circuitos sinápticos con el fin de mejorar la comunicación entre neuronas. Esta propiedad del SNC se denomina plasticidad sináptica. En consecuencia, estas modificaciones permiten el almacenamiento persistente de la información.

Todas las vías de conexión de hipocampo mencionadas anteriormente son de naturaleza excitatoria y dependen principalmente de la liberación de glutamato y la activación de sus receptores post sinápticos, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos últimos favorecen el ingreso del ion calcio, el cual activa diferentes proteínas quinasas que a su vez estimulan la síntesis de proteínas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y diferentes proteínas que participan en las modificaciones del citoesqueleto, con lo cual se producen cambios en la plasticidad estructural, tanto en la morfología como en la densidad de espinas dendríticas (Chidambaram y col., 2019)

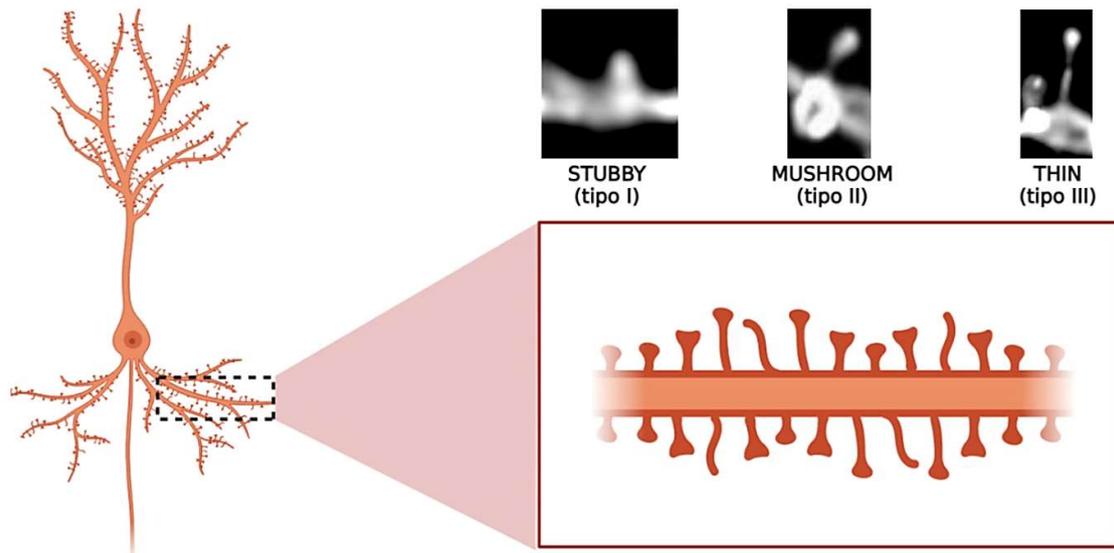
Está ampliamente demostrado que durante la consolidación de la memoria hay un incremento en la síntesis de BDNF. Este factor neurotrófico tiene diferentes funciones que incluyen el desarrollo, crecimiento y supervivencia axonal, participación en las conexiones sinápticas, en la liberación de neurotransmisores y participa en la plasticidad sináptica estructural, favoreciendo la estabilidad de espinas dendríticas (Alonso y col., 2004; Caviedes y col., 2017; Chapleau y Pozzo-Miller, 2012; Zaletel y col., 2017). Además, los cambios estructurales que llevan a la estabilidad de las conexiones sinápticas durante el proceso de consolidación están asociados al incremento en la expresión de diferentes proteínas como F-actina, RhoA, Rac1, proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) y Homer1c, las cuales se correlacionan con la estabilización de los cambios morfológicos de las espinas dendríticas y la fuerza sináptica (Chidambaram y col., 2019; Goto, 2022).

Las espinas dendríticas son protrusiones que adoptan diferentes formas en respuesta a la estimulación sináptica (Parnass y col., 2000). Las espinas, median las conexiones excitatorias ya que se localizan en la membrana postsináptica y reciben la información desde el espacio sináptico. Los cambios morfológicos que experimentan, junto a los avances tecnológicos del análisis de imágenes, han permitido la clasificación de las espinas y la correlación con su actividad sináptica. Una de las metodologías ampliamente utilizada para la clasificación de las espinas se basa en la observación y cuantificación de la longitud del largo total de la espina, del diámetro de su cabeza y del diámetro del cuello. Posteriormente, mediante relaciones entre estas medidas, se clasifican en tres tipos principales: tipo I o “*stubby*”, tipo II o “*mushroom*” y tipo III o “*thin*” (**Fig. 5**) (Koh y col., 2002).

Las espinas “*thin*”, presentan una cabeza de diámetro pequeño y se conectan a la dendrita mediante un cuello estrecho y largo. Las espinas en forma “*mushroom*” tienen una cabeza grande conectada a la dendrita a través de un cuello ancho. Por último, las espinas “*stubby*” no presentan un cuello evidente que conecte su cabeza de gran tamaño con la dendrita (Chapleau y col., 2009).

Numerosas evidencias han demostrado que las espinas con forma de “*mushroom*” y “*stubby*” presentan mayor inserción de receptores AMPA, lo que

sugiere una conexión sináptica estable (Matsuo y col., 2008). En el presente trabajo consideramos ambos tipos de espinas, “*mushroom*” y “*stubby*”, bajo la clasificación de espinas maduras. Por otra parte, se considera que las espinas “*thin*” son altamente dinámicas y precursoras de las espinas maduras (Chidambaram y col., 2019).



**Figura 5- Esquema de neurona piramidal de hipocampo. Imágenes representativas de los diferentes tipos de espinas.** Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

## **MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS DE DRG SOBRE PROCESOS DE MEMORIA**

Como se mencionó anteriormente, el consumo de DRG genera un estado de inflamación periférica crónica leve que mediante diferentes vías de comunicación afecta varias estructuras del cerebro, con mayor incidencia en el hipocampo. Con el fin de abordar potenciales blancos terapéuticos, es esencial entender los posibles mecanismos asociados al consumo de DRG que llevan al daño neuronal.

Estudios en diferentes modelos experimentales, tanto en modelos de ratones genéticamente obesos como en modelos de consumo de dietas que inducen obesidad, han demostrado que el incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) no sólo se limita a afectar a los órganos periféricos, sino que también afecta a diferentes áreas del cerebro, principalmente al hipocampo. Estas citoquinas, en el SNC, activan sus receptores estimulando vías de señalización que incrementan la síntesis local de estos mediadores proinflamatorios los cuales tienen la capacidad de activar a las células de la glía. Además, otras evidencias demuestran que el consumo de DRG afecta la integridad de la BHE favoreciendo el ingreso de citoquinas proinflamatorias al SNC (**Fig. 6**). El excesivo aumento de los mediadores inflamatorios en el cerebro es capaz de producir daños en la actividad y plasticidad neuronal. Estos daños neuronales predisponen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Golia y col., 2019; Olsthoorn y col., 2021; Sharma, 2021; Valcarcel-Ares y col., 2019).

Particularmente, en nuestro grupo de investigación estudiamos el efecto de IL-1 $\beta$  sobre cambios en la plasticidad estructural durante la consolidación de una memoria de miedo contextual. Hemos observado una disminución en la densidad total de espinas dendríticas en la región CA1 de hipocampo dorsal, que se correlacionó con la disminución de espinas dendríticas maduras. Este resultado fue consistente con antecedentes previos del grupo donde se demostró que IL-1 $\beta$  indujo un deterioro en la expresión de la memoria de miedo contextual asociado a la disminución en la liberación de glutamato, la disminución en la fosforilación de proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), el cual se activa luego de la estimulación del receptor NMDA en presencia de glutamato y la disminución en la expresión de BDNF (Gonzalez y col., 2009; Herrera y col., 2019).

Además, existen numerosos reportes que describen los efectos de las citoquinas proinflamatorias sobre la plasticidad neuronal mediante el empleo de la potenciación a largo plazo (LTP). Esta herramienta permite evaluar la capacidad de respuesta de los circuitos sinápticos luego de una estimulación de alta frecuencia (Lomo, 2003). Se ha demostrado que la presencia de IL-1 $\beta$  reduce el

LTP de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo dorsal (Bellinger y col., 1993).

Numerosos estudios demostraron que la estimulación del SI fue capaz de aumentar los niveles de IL-1 $\beta$ , y observaron un efecto negativo en el LTP, disminución en la expresión de BDNF, disminución en la activación del receptor AMPA y disminución de PSD 95 (Di Filippo y col., 2013; Golia y col., 2019; Hikosaka y col., 2022; Song y col., 2020; Yang y col., 2019).

En el contexto neuroinflamatorio que subyace al consumo de DRG, se ha reportado un efecto desfavorable en la generación del LTP en hipocampo. Con la finalidad de comprender los procesos moleculares que interfieren en la disminución del LTP se han investigado cambios en proteínas específicas involucradas tanto en la actividad presináptica (sinaptofisina), como en la actividad postsináptica (PSD 95), observándose en ambos casos una disminución en animales alimentados con DRG. También, se observó la desregulación de la enzima calcio/calmodulina quinasa II (CaMKII), la cual modula la actividad de proteínas de la densidad postsináptica, y la desregulación de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA postsinápticos. En consistencia con estos reportes, se han observado cambios en la expresión de genes involucrados en la actividad sináptica y cambios en la plasticidad estructural, con disminución de la densidad total de espinas dendríticas (**Fig. 6**) (Dingess y col., 2017; Hao y col., 2016; Valcarcel-Ares y col., 2019; Wang y col., 2020).

Asociado a la neuroinflamación inducida por el consumo de DRG se produce un aumento del estrés oxidativo, que se define como el incremento en la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ERO).

Las neuronas, son células con gran actividad metabólica y consumo de oxígeno, con lo cual presentan una alta producción de ERO. Sin embargo, estas ERO son neutralizadas por acción de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) y de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular (glutatión, ácido úrico, ácido ascórbico y melatonina). Cuando existe un incremento de ERO que excede la capacidad antioxidante de las neuronas ocurre la oxidación de las proteínas y de los lípidos, en consecuencia, se produce

un daño oxidativo y degeneración celular. Asociado a este desbalance en la capacidad antioxidante de las neuronas se ha demostrado una disminución en el LTP, un deterioro en los mecanismos asociados a la plasticidad sináptica y un efecto negativo sobre los procesos de formación de memoria (Biswas y col., 2022; Massaad y Klann, 2011; Salim, 2017; Wang y Michaelis, 2010).

El incremento de citoquinas proinflamatorias en el microambiente neuronal afecta el balance entre la producción de ERO y el sistema antioxidante, con lo cual se encuentra favorecida la formación de ERO. Las ERO presentan gran inestabilidad y reactividad, siendo capaces de reaccionar con macromoléculas presentes en las células: ADN, lípidos y proteínas. De esta manera generan un daño celular, ya que reaccionan con los componentes que forman parte de la membrana (lípidos y proteínas). Los productos generados son más estables y han sido utilizados ampliamente para medir, de manera indirecta, el estado de estrés oxidativo (Ogundele y col., 2014).

Durante el proceso de neuroinflamación las principales células residentes del SNC encargadas de responder a estos cambios en el microambiente son las células de la glía, de la cual forman parte la microglía y los astrocitos (**Fig. 6**). Estas células contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del SNC con un rol importante en la maduración, supervivencia y actividad neuronal y en la sinaptogénesis, así también como en la conservación de las conexiones sinápticas en condiciones fisiológicas. En condiciones fisiopatológicas, como daño neuronal o infecciones son las primeras en detectar los cambios y responder a estos.

La microglía en su estado reactivo (M1) es capaz de influenciar a los astrocitos y las neuronas adyacentes mediante la liberación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) (Liu y Quan, 2018; Olcum y col., 2020; Sabogal-Guáqueta y col., 2020).

El desbalance del estado redox de los astrocitos lleva a la peroxidación lipídica, que afecta a los fosfolípidos de la membrana de las neuronas y el producto resultante de esta interacción (malondialdehído, MDA) es un indicador del aumento de estrés oxidativo. Por otra parte, las proteínas presentes en la membrana celular que incluyen enzimas, proteínas con funciones de conexión y

proteínas que forman transportadores, como el transportador del neurotransmisor glutamato, también son oxidadas por la presencia de las ERO. El producto final de la oxidación proteica (AOPP), es un marcador del estrés oxidativo.

La presencia de ERO estimula la polarización de los astrocitos a su estado reactivo, y en consecuencia se activan diferentes vías de señalización que favorecen la síntesis y liberación de más citoquinas proinflamatorias. Además, la presencia de ERO produce un aumento en la expresión de proteínas de filamento intermedio (GFAP) lo cual está asociado con cambios en la morfología e incremento en las proyecciones de las células astrocitarias (Daverey y Agrawal, 2016).

Todos estos efectos llevan a una disrupción en la interacción de los astrocitos con las neuronas, con un consecuente daño neuronal (Lee y col., 2021; Swarnkar y col., 2009; Zhu y col., 2022).

La función de los astrocitos en condiciones fisiológicas es muy importante, ya que cumplen un rol fundamental en la formación, mantención y estabilidad de las conexiones sinápticas. Esto es debido a la comunicación bidireccional que existe entre las neuronas y los astrocitos. Dentro de las funciones que favorecen las conexiones sinápticas, los astrocitos presentan receptores de neurotransmisores que les confieren la capacidad de responder ante la actividad neuronal, siendo capaces de liberar gliotransmisores. Por otra parte, son responsables de la recaptación del glutamato presente en la sinapsis, evitando así la neurotoxicidad. Además, se ha demostrado que la activación selectiva de astrocitos en CA1 durante la adquisición de una memoria de miedo contextual aumenta la expresión de esta memoria al ser testeada 24 h después (Adamsky y col., 2018; Lyon y Allen, 2022). Los astrocitos, también forman parte de los componentes de la BHE y participan en el control de la permeabilidad selectiva que permite el intercambio de nutrientes y desechos entre el SNC y la periferia (Preininger y Kaufer, 2022).

Cambios en el microambiente o en los vasos que irrigan al SNC son detectados por los astrocitos, los cuales responden modificando sus funciones. Se producen modificaciones en la expresión de proteínas que son características de un perfil

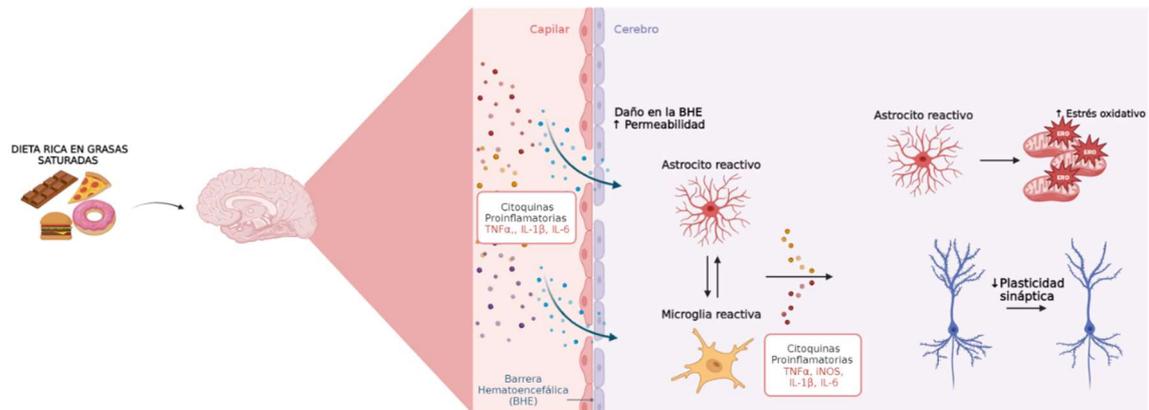
de astrocitos reactivos que incluye el aumento de GFAP y cambios estructurales como hipertrofia del cuerpo celular y de sus proyecciones. Este incremento en la expresión de GFAP también se induce ante el daño cerebral, la degeneración del SNC y además aumenta con la edad (Middeldorp y Hol, 2011).

En este contexto, se ve comprometida su interacción con las neuronas afectando la participación en la transmisión sináptica y se modifica la expresión de proteínas hacia un perfil inflamatorio favoreciendo la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios como quimioquinas (CCL2, CCL5 y CXCL10) y citoquinas (IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ ) (Hyvärinen y col., 2019; Soung y Klein, 2020).

Las características de la gliosis reactiva son altamente heterogéneas y pueden, dependiendo de las circunstancias, proteger o perpetuar la patología subyacente. Se ha descrito la presencia de diferentes subpoblaciones de astrocitos en respuesta a diferentes estímulos nocivos para el SNC y en el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Estas subpoblaciones pueden adquirir un perfil proinflamatorio (frecuentemente denominados A1), el cual estaría favoreciendo la expresión de mediadores inflamatorios, o bien pueden adquirir un perfil antiinflamatorio (frecuentemente denominados A2) caracterizado por el aumento en la expresión de genes que favorecen la supervivencia y el crecimiento de neuronas y contribuyen en las funciones regenerativas (Fan y Huo, 2021; Fei y col., 2022). Un marcador de la gliosis reactiva, como ya se mencionó, es el incremento de ciertas moléculas como GFAP, vimentina, nestina y otras. Es interesante destacar que GFAP aumenta tanto en astrocitos reactivos A1 como A2 (Potokar y col., 2020).

Actualmente se utilizan distintos marcadores moleculares para distinguir diferentes poblaciones de astrocitos reactivos. Numerosas publicaciones establecen múltiples parámetros moleculares y funcionales e incluso el impacto en las características patológicas de modelos de neurodegeneración, que llevan a nuevas nomenclaturas y definiciones de los astrocitos reactivos (Escartin y col., 2021).

La presencia de citoquinas proinflamatorias, el desbalance oxidativo y el estado reactivo de astrocitos se han asociado a una interferencia en la plasticidad sináptica tanto funcional, como estructural (**Fig. 6**).



**Figura 6-** Esquema representativo de los efectos del consumo de dietas ricas en grasas saturadas (DRG) en el sistema nervioso central (SNC). Daño de la barrera hematoencefálica, reactividad de las células gliales, alteraciones en la plasticidad sináptica. Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

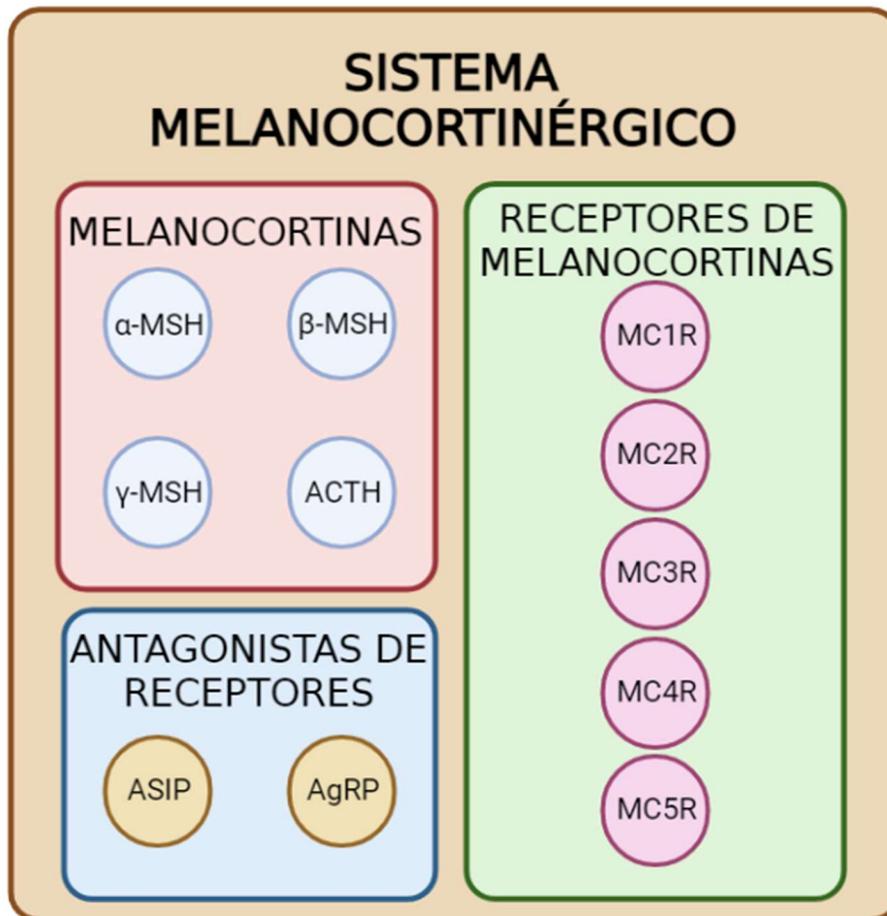
## SISTEMA MELANOCORTINÉRGICO

El sistema melanocortinérgico está constituido por las melanocortinas (MC), los receptores (MCR) y los antagonistas de receptores melanocortinérgicos. Las MC son péptidos endógenos que derivan de una proteína precursora común llamada proopiomelanocortina (POMC). A través del procesamiento diferencial de la POMC mediante enzimas denominadas convertasas, que se encuentran presentes selectivamente en diferentes tejidos, se produce la síntesis de productos finales diferentes (Benjannet y col., 1991; Pritchard y col., 2002). Estos constituyen las MC, las cuales son un grupo de péptidos endógenos integrados por las hormonas melanocito estimulante  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH),  $\beta$  ( $\beta$ -MSH),  $\gamma$  ( $\gamma$ -MSH) y la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) (**Fig. 7**). La actividad biológica de las MCs está determinada por una secuencia común de aminoácidos (His-Phe-Arg-Trp) (Holder y Haskell-Luevano, 2004).

Este conjunto de MC ejerce su efecto mediante la activación de los receptores melanocortinérgicos. Los MCR constituyen una familia, de los cuales se han identificado desde el MC1R al MC5R, hasta la actualidad (Wikberg y col., 2000) **(Fig. 7)**. Estos receptores presentan 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteína G. Los MCR presentan diferencias entre sí lo que determina el grado de afinidad por las MC y los antagonistas (Abdel-Malek, 2001), y se expresan en regiones específicas del organismo.

MC1R se expresa en la piel y presenta gran afinidad por  $\alpha$ -MSH. La estimulación de este receptor interviene en el proceso de melanogénesis. Además, se ha demostrado su expresión en células del SI donde media su acción antiinflamatoria, al ser estimulado por  $\alpha$ -MSH. MC2R presenta afinidad selectiva por ACTH, y se encuentra expresado en la glándula adrenal donde participa en la síntesis de esteroides. MC3R se encuentra presente en el SNC y en diferentes tejidos periféricos, en la placenta e intestino. Este receptor es activado con mayor afinidad por  $\gamma$ -MSH y ACTH, y en menor medida por  $\alpha$ -MSH; su activación regula la homeostasis de la energía y el control de la inflamación. MC4R se expresa predominantemente en el SNC en diferentes áreas, entre ellas el hipotálamo, tálamo, corteza e hipocampo. Tiene alta afinidad por  $\alpha$ -MSH y su activación, al igual que la de MC3R, participa en la regulación de la homeostasis de la energía y en la regulación de procesos inflamatorios. Por último, MC5R se encuentra expresado en diversos tejidos periféricos donde participa en la regulación de la actividad de glándulas exocrinas sebáceas (Catania y col., 2004; Gantz y Fong, 2003).

Los péptidos antagonistas que forman parte del sistema melanocortinérgico son la proteína agouti y la proteína relacionada al gen agouti (AgRP) **(Fig. 7)**. Son péptidos endógenos con actividad paracrina que también presentan selectividad en la unión a los MCR. Agouti se expresa en la piel y se relaciona con la regulación de la pigmentación. Mientras que AgRP se expresa en neuronas del núcleo arcuato y presenta actividad antagonista de los receptores MC3R y MC4R (Blanchard y col., 1995; Dinulescu y Cone, 2000; Gantz y Fong, 2003; Wikberg y col., 2000).



**Figura 7- Sistema melanocortinérgico.** Abreviaturas: MSH; hormona melanocito estimulante, ASIP: proteína de señalización agouti, AgRP: proteína relacionada al gen agouti, MCR: receptores de melanocortinas. Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

Dentro de la familia de las melanocortinas, es de interés para el presente trabajo la hormona alfa melanocito estimulante, α-MSH. Se ha demostrado que este péptido endógeno presenta gran acción antiinflamatoria, antipirética y un potente rol neuroprotector. α-MSH actúa mediante la activación de los receptores MC3 y MC4. En el cerebro se observó gran expresión del MC3R en corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala y septum. En cuanto al receptor MC4, se encuentra expresado principalmente en cerebro, en diversas áreas como en el tálamo, hipotálamo, hipocampo (girus dentado y regiones CA1 y CA2), corteza y amígdala. La activación de estos receptores media respuestas que incluyen la

regulación de la ingesta de alimentos, el metabolismo energético y control de la inflamación (Catania y col., 2004; Chen y col., 2000; Getting y Perretti, 2000).

$\alpha$ -MSH es predominantemente producida en la parte intermedia de la glándula pituitaria, en el núcleo arcuato del hipotálamo y el núcleo del tracto solitario en el tallo cerebral. Las neuronas POMC presentes en el núcleo arcuato proyectan fibras, denominadas fibras melanocortinérgicas, hacia diferentes áreas cerebrales como al núcleo paraventricular y lateral del hipotálamo, núcleo acumbens, tálamo, corteza, tallo cerebral, amígdala, hipocampo y médula espinal (Bertagna y col., 1986; Mountjoy, 2015). Además, Yang Shen y col. han demostrado la existencia del circuito POMC/ $\alpha$ -MSH/MC4R hipocampal. En su trabajo describen la expresión de células POMC principalmente en neuronas piramidales del área CA3 de hipocampo, las cuales al ser estimuladas aumentan la secreción de  $\alpha$ -MSH. En el área CA1 encuentran niveles elevados en la expresión del MC4R, que es activado mediante la unión de  $\alpha$ -MSH proveniente de CA3. Demostraron que el bloqueo de este circuito, POMC/ $\alpha$ -MSH/MC4R hipocampal, interfiere en el LTP, evidenciando defectos en la plasticidad sináptica (Shen y col., 2016).

### **Mecanismos de acción de $\alpha$ -MSH**

Como ya fue mencionado,  $\alpha$ -MSH presenta gran afinidad por el receptor MC4. La vía de señalización que predomina incluye la activación de la enzima adenilato ciclasa, la que en consecuencia produce un aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). De esta manera, AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), estimulando así la expresión génica (Caruso y col., 2010, 2012; Luger y Brzoska, 2007; Sarkar y col., 2002; Schiöth y col., 2014; Sutton y col., 2005). Se conoce además que la activación de MC3R y MC4R puede inducir un incremento de calcio intracelular independientemente de la activación de PKA (Catania y col., 2010; Eves y col., 2003; Konda y col., 1994; Newman y col., 2006). Otra vía de señalización descrita en un modelo de isquemia cerebral demuestra una interacción entre  $\alpha$ -MSH, la atenuación de la activación de p38 y la disminución de la quinasa activada por estrés, c-Jun N-terminal (JNK). En este modelo también observaron la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y en

consecuencia la disminución en la producción de TNF- $\alpha$  (Eves y Haycock, 2010; Giuliani y col., 2006, 2014a). Por otro lado, la inhibición de NF- $\kappa$ B puede deberse al aumento de AMPc y la activación de PKA que impiden la fosforilación de I- $\kappa$ B, lo cual es necesario para la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo (Natarajan y col., 1998; Váradi y col., 2017). Otra vía de señalización ligada a la atenuación en la activación de p38 y JNK, es la vía de fosforilación de MAPK ERK1/2, la cual es estimulada por la activación de los receptores MC4 (**Fig. 8**) (Chai y col., 2006, 2007; Herraiz y col., 2011; Vongs y col., 2004).

### **Efecto antiinflamatorio y antioxidante de $\alpha$ -MSH**

La potencial acción antiinflamatoria de  $\alpha$ -MSH ha sido demostrada en diversos modelos animales de inflamación como dermatitis, vasculitis cutánea, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide e inflamación ocular. En estos modelos, la aplicación tópica o intraperitoneal de  $\alpha$ -MSH resultó en la atenuación de los daños inflamatorios de la mucosa y la piel.

En varios experimentos in vitro, con diferentes tipos celulares, en los cuales se estimuló la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo mediante el tratamiento con LPS, IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , se observó una disminución de esta translocación en presencia de  $\alpha$ -MSH (Catania y col., 2010; Luger y Brzoska, 2007).

Se ha demostrado el efecto modulador de  $\alpha$ -MSH en la producción de TNF- $\alpha$  y óxido nítrico (ON) en la circulación, los pulmones e hígado de ratones con endotoxemia al ser tratados por vía intracerebroventricular con  $\alpha$ -MSH, en bajas concentraciones (Catania y col., 1999; Hernández y col., 1999).

En cuanto a la acción de  $\alpha$ -MSH a nivel del hipotálamo, bajo la inducción de endotoxemia se ha demostrado que la administración local de  $\alpha$ -MSH en el hipotálamo medio basal disminuyó la expresión de iNOS y ciclooxigenasa 2 (COX-2) a través de la activación de MC4R (Caruso y col., 2004).

Es importante mencionar que se ha demostrado la expresión de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) para los receptores de  $\alpha$ -MSH en cultivo de líneas celulares humanas, tanto de microglía como de astrocitos. Asimismo, la estimulación de estas células con agentes proinflamatorios y el consecuente incremento de citoquinas inflamatorias se vio inhibido luego de ser tratadas con

$\alpha$ -MSH o moléculas análogas (Lindberg y col., 2005; Wong y col., 1997). Por otro lado, se evidenció en cultivo de astrocitos provenientes de ratas la expresión del MC4R, pero no del MC3R. También, se ha demostrado que el tratamiento del cultivo con  $\alpha$ -MSH inhibió el incremento de mediadores inflamatorios; ON, prostaglandina E2 (PGE2), iNOS y COX-2, inducidos mediante la exposición a LPS/IFN- $\gamma$ . Además,  $\alpha$ -MSH contrarrestó el incremento de la proteína proapoptótica, Bax (Caruso y col., 2007a).

Asimismo, se ha demostrado la expresión de MC4R en células microgliales que al ser estimuladas con NDP- $\alpha$ -MSH, un análogo de  $\alpha$ -MSH, se produce una inhibición de los mecanismos que favorecen la liberación de mediadores inflamatorios y se promueve el fenotipo microglial M2, cuya acción incluye inmunomodulación, inmunosupresión y reparación tisular (Carniglia y col., 2013, 2016; Delgado y col., 1998).

Podemos encontrar un gran número de publicaciones referidas a la acción antiinflamatoria y neuroprotectora de  $\alpha$ -MSH, sin embargo, poco se ha profundizado sobre los efectos antioxidantes de  $\alpha$ -MSH. Ramirez y col., demostraron recientemente que en cultivos de astrocitos tratados con ácido palmítico (ácido graso libre, abundante en alimentos calóricos) aumentan los niveles de ERO, se reduce la expresión de BDNF y la actividad de SOD (enzima antioxidante), mientras que la coincubación con NDP- $\alpha$ -MSH revierte estos efectos a niveles comparables a cultivos de astrocitos controles (**Fig. 9**) (Ramírez y col., 2019). En otro modelo *in vitro*, donde neuronas de hipocampo expuestas a etanol presentaron un daño mitocondrial y aumento de estrés oxidativo (incremento en los niveles de ERO), la estimulación del receptor MC4 atenúa estos efectos. En este mismo estudio, se evidenció que la vía de señalización involucrada en el efecto antioxidante fue mediante la translocación del factor de transcripción Nrf-2, el cual activa la expresión de varias enzimas antioxidantes como ligasa glutamato-cisteína, hemo-oxigenasa y NADPH oxido-reductasa 1 (Quintanilla y col., 2020).

### **Efecto neuroprotector de $\alpha$ -MSH**

La acción neuroprotectora que presenta  $\alpha$ -MSH es gran interés de estudio en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer (EA), modelos de isquemia cerebral y modelos de neuroinflamación.

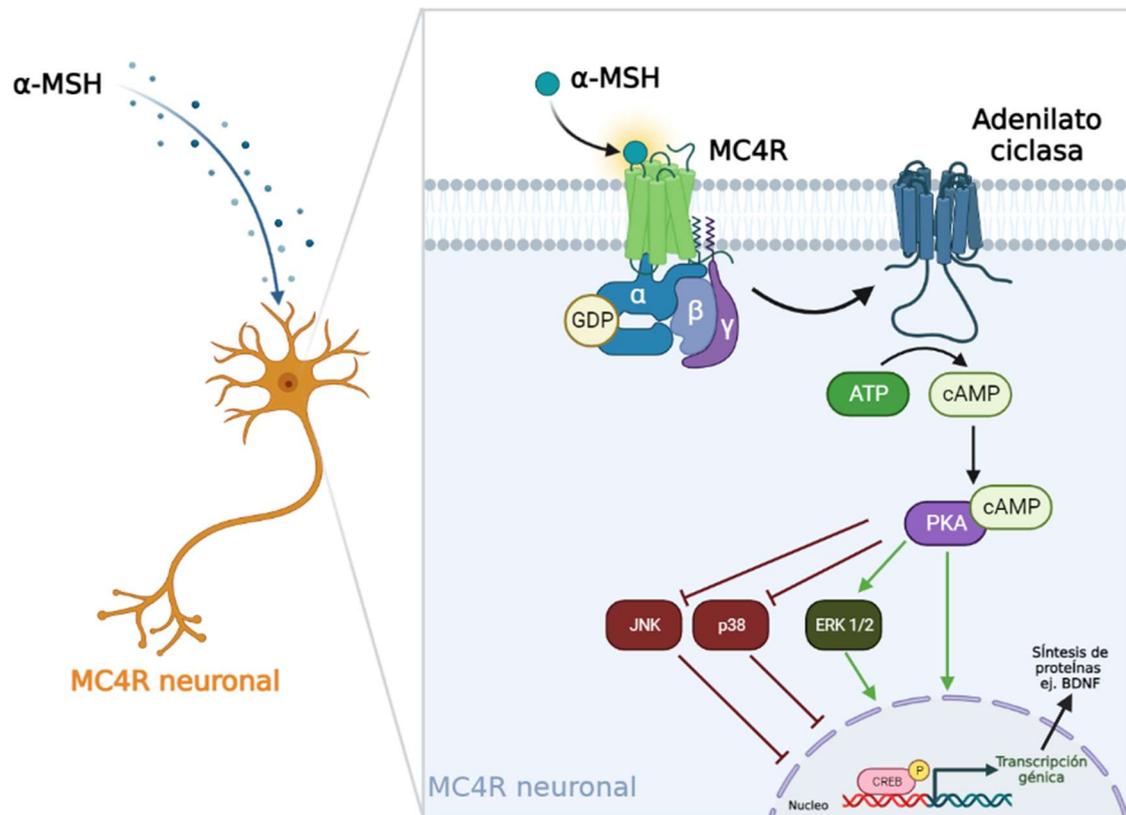
En relación al uso de modelos de ratones transgénicos de la EA, al ser tratados con agonistas del MC4R observaron disminución en el depósito de las placas de Amiloide  $\beta$ , con disminución tanto de astrocitos neurotóxicos como de activación de la microglía, efectos que fueron acompañados además con la atenuación de la neuroinflamación (Lau y col., 2021). Además, otro grupo de investigación demostró que el tratamiento con NDP- $\alpha$ -MSH es capaz de revertir el deterioro cognitivo asociado a la EA mediante la disminución de la pérdida neuronal, el aumento en la expresión de factor de transcripción dedos de zinc (Zif268), al mismo tiempo que estimula la neurogénesis en giro dentado (Giuliani y col., 2014b, 2015).

Por otro lado, se demostró en un modelo de isquemia cerebral que el tratamiento con NDP- $\alpha$ -MSH es capaz de recuperar el daño en el tejido, contrarresta la respuesta inflamatoria y apoptótica en hipocampo, efectos también acompañados con el aumento en la expresión de Zif268. Además, NDP- $\alpha$ -MSH revertió el déficit observado en la memoria espacial (dependiente de hipocampo) en el modelo de isquemia cerebral (Giuliani y col., 2006, 2009; Spaccapelo y col., 2011).

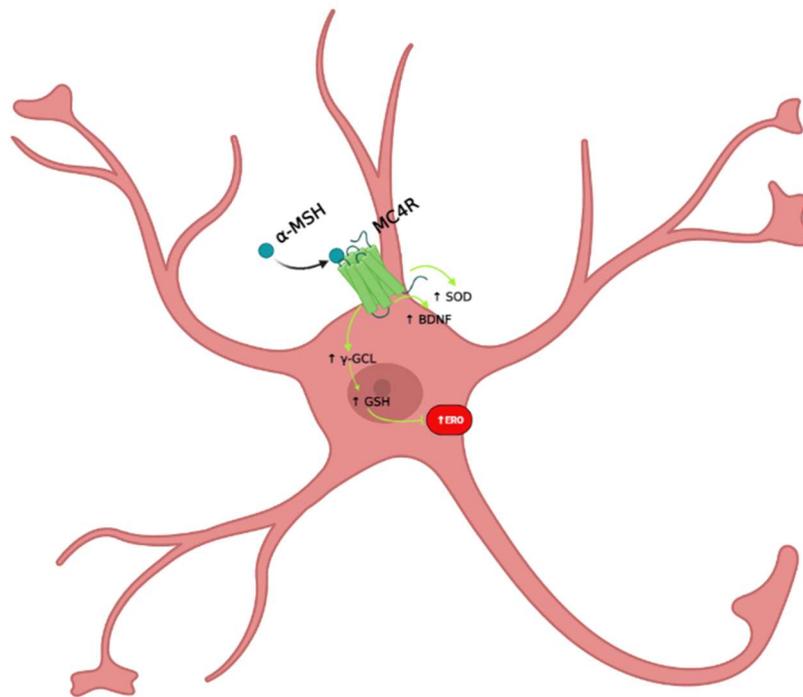
Nuestro grupo de trabajo demostró el efecto neuroprotector de  $\alpha$ -MSH en un modelo de neuroinflamación aguda, mediante la administración intrahipocampal de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Esta citoquina demostró interferir en los procesos de consolidación y reconsolidación de una memoria de miedo contextual. El tratamiento con  $\alpha$ -MSH, también administrado de manera intrahipocampal, logró revertir el efecto de IL-1 $\beta$  en ambas etapas de la memoria. Los mecanismos propuestos en relación al proceso de reconsolidación describen una posible activación a nivel postsináptico del MC4R, lo cual lleva a un incremento en la expresión de Zif268, restaura los niveles de ERK fosforilado e incide sobre la expresión en superficie y la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA (Machado y col., 2010, 2018).

En cuanto al efecto protector observado en la etapa de consolidación de una memoria de miedo asociada al contexto se demostró que  $\alpha$ -MSH atenúa el déficit en la expresión de esta memoria ocasionada por IL-1 $\beta$  posiblemente mediante la acción a nivel postsináptico, a través de la activación del MC4R. La activación del receptor restableció los niveles de ERK fosforilado y de la proteína BDNF (Gonzalez y col., 2013, 2009). Teniendo en cuenta que la expresión de BDNF es importante durante el aprendizaje contextual, ya que una de sus funciones es la regulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo, evaluamos los cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas en hipocampo dorsal. Observamos que IL-1 $\beta$  administrada de manera intrahipocampal disminuye la densidad total de las espinas dendríticas a expensa de la disminución de la densidad de espinas maduras, mientras que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH revierte este efecto, en concordancia con la variación observada en los niveles de la proteína BDNF (Herrera y col., 2019).

Estas propiedades del neuropéptido  $\alpha$ -MSH hacen que sea de gran interés su estudio como posible blanco terapéutico en el tratamiento de patologías neuroinflamatorias y neurodegenerativas.



**Figura 8- Eventos bioquímicos intracelulares implicados en los efectos de  $\alpha$ -MSH en neuronas.** Abreviaturas:  $\alpha$ -MSH, hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante; MC4R, receptor MC4; GDP, guanosín difosfato; ATP, adenosín trifosfato; cAMP, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína quinasa A; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; JNK, quinasa N-terminal c-Jun; CREB, proteína de unión al elemento que responde a AMPc; P, fosforo. Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).



**Figura 9- Eventos bioquímicos intracelulares implicados en la acción antioxidante de  $\alpha$ -MSH en astrocitos estimulados con ácido palmítico.** Abreviaturas:  $\alpha$ -MSH, hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante; MC4R, receptor MC4; SOD, superóxido dismutasa; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro;  $\gamma$ -GCL, gama cisteína glutamato ligasa; GSH, glutatión; ERO, especies reactivas de oxígeno. Figura adaptada de (Ramírez y col., 2019). Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes expuestos, el consumo de DRG es capaz de generar inflamación periférica crónica de baja intensidad y en consecuencia afectar al SNC mediante la activación de procesos inflamatorios y estrés oxidativo. El consumo de estas dietas en un periodo corto de tiempo sensibiliza al sistema inmunológico, el cual ante un estímulo débil responde de manera exacerbada y afecta al SNC mediante alteraciones consistentes con neuroinflamación. En ambos casos (consumo prolongado o corto de DRG) una de las áreas del cerebro más vulnerable es hipocampo, por lo que se produce un deterioro cognitivo.

El péptido  $\alpha$ -MSH, mediante su acción antiinflamatoria y neuroprotectora revierte los efectos de la neuroinflamación sobre los procesos cognitivos dependientes de hipocampo, inducidos por la ingesta de DRG.

## **OBJETIVO GENERAL**

En el presente trabajo de tesis, nos proponemos como objetivo general abordar el impacto de la ingesta de una DRG durante un período corto (5 días) más un estímulo inmune débil (LPS) sobre la consolidación de una memoria contextual de miedo, determinando cambios en la plasticidad estructural (densidad y forma de espinas dendríticas), el estrés oxidativo y la reactividad astrocitaria en hipocampo dorsal.

Además, nos proponemos determinar si  $\alpha$ -MSH puede revertir los efectos de la neuroinflamación debida al consumo de DRG sobre procesos cognitivos dependientes de hipocampo, estableciendo los posibles mecanismos involucrados, a nivel de las células neuronales y gliales.

El conocimiento de los efectos antiinflamatorios y neuroprotectivos de  $\alpha$ -MSH en el modelo experimental nos motiva a evaluar posibles métodos de intervención terapéutica. Por consiguiente, abordamos el desarrollo y determinación de la eficacia de una nanoterapia.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando un modelo experimental de ratas Wistar alimentadas con DRG durante cinco días más un estímulo inmune débil, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Evaluar los efectos sobre la consolidación de una memoria contextual de miedo.
2. Estudiar cambios en la plasticidad estructural (densidad y forma de espinas dendríticas), el estrés oxidativo y la reactividad astrocitaria en hipocampo dorsal.

Teniendo en cuenta la acción antiinflamatoria y neuroprotectora de  $\alpha$ -MSH reportada por diferentes trabajos y por nuestro laboratorio, nos propusimos determinar en el presente modelo experimental:

3. El efecto de  $\alpha$ -MSH sobre la consolidación de una memoria contextual.
4. El efecto de  $\alpha$ -MSH sobre los cambios en la plasticidad estructural (densidad y forma de espinas dendríticas) en hipocampo dorsal durante el proceso de consolidación de una memoria contextual de miedo.
5. El efecto de  $\alpha$ -MSH sobre el estrés oxidativo.
6. El efecto de  $\alpha$ -MSH sobre la reactividad de astrocitos hipocampales mediante la cuantificación de la expresión de GFAP y la proliferación.

Con el propósito de buscar métodos terapéuticos menos invasivos, que permitan estabilizar y proteger a  $\alpha$ -MSH de la degradación enzimática, nos propusimos:

7. Determinar la eficacia de una nanoterapia con NDP- $\alpha$ -MSH sobre las secuelas cognitivas asociadas al consumo de DRG durante 5 días más un estímulo inmune.
8. Determinar la eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH sobre las secuelas cognitivas asociadas al consumo de DRG durante 8 semanas.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **ANIMALES**

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar criadas en el bioterio del Departamento de Farmacología Otto Orsingher, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, IFEC-CONICET. Los animales se alojaron en grupos de 3 ó 4 individuos en cajas de plástico estándar de laboratorio (Plexiglas), con libre acceso al agua y al alimento. Los animales fueron albergados en salas con ciclo de 12 h de luz/oscuridad (encendido de luz de 7:00 a 19:00 h) y con temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C. Los procedimientos experimentales fueron realizados entre las 10:00 y 14:00 h.

Para los experimentos de ingesta corta de DRG, durante cinco días, se utilizaron ratas machos de dos meses de edad. Para el experimento de ingesta prolongada (ocho semanas) se utilizaron animales de 45 días de edad. En ambos casos se dividieron en dos grupos al azar para ser expuestos a las diferentes dietas (dieta comercial estándar y dieta rica en grasas) con libre acceso.

Los animales fueron habituados al contacto con el experimentador; para ello fueron trasladados a una habitación diferente, manipulados y luego retornados a sus cajas y a su sala de alojamiento común. Este procedimiento se repitió 3 días previos de iniciarse los experimentos. Las ratas fueron asignadas al azar a los distintos grupos experimentales y cada una fue utilizada una sola vez. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo siguiendo las normas establecidas por el CICUAL de la FCQ-UNC, de acuerdo con los lineamientos establecidos por la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud (NIH - National Institute of Health) de Estados Unidos de América. Se aprobó el protocolo presentado para el uso de animales de experimentación mediante las resoluciones: Res HCD 1503/2017 y RD-2021-809-E-UNC-DEC.

Todos los experimentos del presente trabajo de tesis se realizaron con ratas machos, ya que en el actual bioterio del IFEC no se pueden alojar hembras y machos en las salas de tratamiento, ya que la presencia de hembras ciclando en la misma habitación pueden ocasionar cambios conductuales en los machos, lo cual dificulta trabajar con ambos sexos. Por otra parte, el uso de ratas hembras

requiere de la determinación del ciclo estral para realizar todas las pruebas experimentales con las hembras en el mismo día del ciclo, ya que los resultados podrían verse afectados por los niveles hormonales. Actualmente es cuestionable el hecho de que al ciclar cada día a los animales se incluye una variable de estrés (que los machos no reciben) y podría incidir en los resultados. En consecuencia, esto requiere de un gran número de animales, para disponer de un número apropiado para cada experimento, con hembras en el mismo día del ciclo. Debido a estos motivos no se incluyó un estudio paralelo en hembras.

### DIETA

Los animales fueron divididos en dos grupos al azar y luego alimentados con una dieta estándar (grupo Dieta Control - DC: 31.65% de las calorías provenientes de proteínas, 57.41% de las calorías provenientes de hidratos de carbono y 10.94% de las calorías provenientes de las grasas) o una dieta con alto contenido en grasas (grupo Dieta Rica en Grasas – DRG 19.88% de las calorías provenientes de proteínas, 23.50% de las calorías provenientes de hidratos de carbono y 56.62 de las calorías provenientes de grasas). La ingesta y el peso fueron monitoreados diariamente (experimentos DRG cinco días) o semanalmente (experimento DRG ocho semanas).

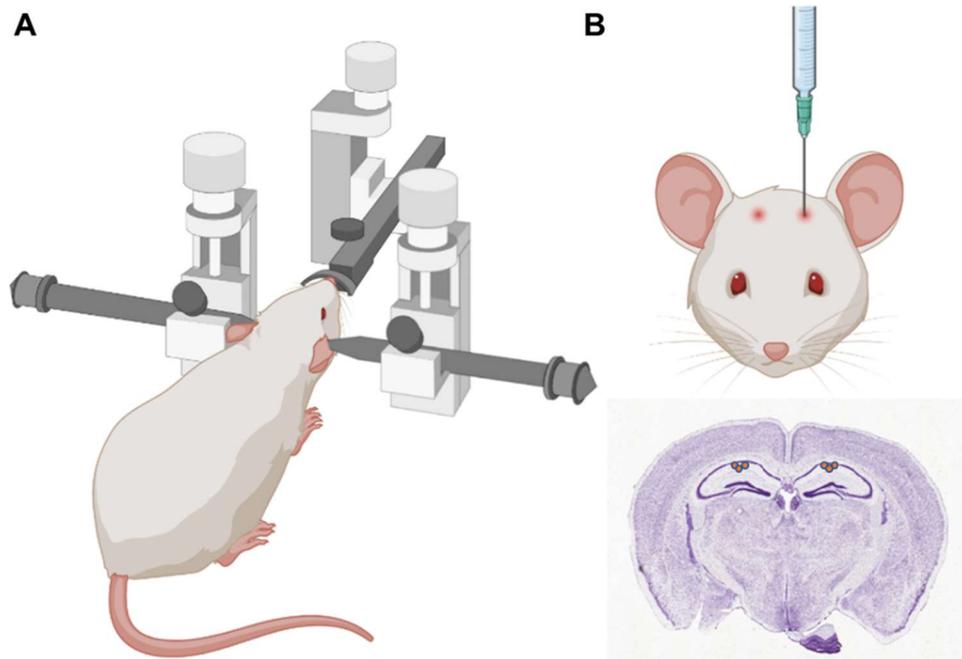
### CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Los animales expuestos a la DRG durante cinco días fueron previamente implantados bilateralmente en el área CA1 del hipocampo dorsal (HD) mediante técnicas estereotáxicas (**Fig. 10A**). Cada animal fue anestesiado mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de Ketamina (55 mg/kg) (Holliday) y Xilazina (10 mg/Kg) (Holliday) y colocado en el aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL) con la barra dental incisiva ubicada a -3.3 mm. Se realizó un corte en el cuero cabelludo para visualizar el cráneo y tomar las coordenadas según la posición del Bregma. Se realizaron dos orificios en el cráneo para implantar

las cánulas guías de acero inoxidable (22G) de 9 mm longitud. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con un tornillo y acrílico dental. Las coordenadas para el área CA1 de hipocampo dorsal fueron tomadas del atlas de Paxinos, 2007 siendo las siguientes: anteroposterior (AP), -3,2 mm; lateral (L)  $\pm 1.8$  mm; dorso ventral (DV), -1,9 mm. Las cánulas guías pasan el cuerpo caloso y quedan ubicadas justo por encima del área CA1, sin dañarla (**Fig. 10B**). Los animales fueron retirados del estereotáxico y colocados en una caja separada bajo supervisión constante hasta su recuperación. Después de la cirugía los animales recibieron una inyección subcutánea de una suspensión de estreptomicina y penicilina (Norcilina; Laboratorios NORT, Argentina) a fin de reducir el riesgo de infecciones. El tiempo de recuperación de la cirugía fue de 7 días. Durante este periodo, los animales comenzaron el periodo de ingesta de la DRG y los tres días previos a realizarse los experimentos fueron manipulados y se simuló la microinyección con el fin de minimizar las respuestas no específicas a este procedimiento durante el experimento.

### **INYECCIÓN INTRAHIPOCAMPAL**

Para la realización del tratamiento intrahipocampal, se elaboraron inyectoros con agujas de acero inoxidable (30G) de 10 mm de longitud que sobrepasaban la cánula guía en 1 mm. Al momento de la inyección intrahipocampal los animales fueron cubiertos con un paño, suavemente sujetados y se introdujeron los inyectoros en las cánulas guía. La inyección intrahipocampal fue realizada mediante la conexión del inyector a través de un tubo de polietileno (PE 10, Becton Dickinson, MD) a una jeringa de 10 $\mu$ l (Hamilton, Reno, NV) montada en una bomba de microinyección (Stoelting, Illinois, USA). Cada animal fue inyectado bilateralmente con 0,25  $\mu$ l de solución con una velocidad de flujo de 0,25  $\mu$ l/min. Los inyectoros permanecieron en las cánulas guías durante un min adicional, para permitir la difusión de la droga.



**Figura 10. A- Cirugía estereotáxica. B- Sitio de inyección intrahipocampal.**  
Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### **DROGAS: ADMINISTRACIÓN Y DOSIS**

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron diferentes vías de administración de los tratamientos, intraperitoneal (i.p.) e intrahipocampal.

Para la administración el estímulo inmune débil se utilizó una solución de LPS *E. coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich, Argentina) reconstituido en solución salina estéril 0.9%, las alícuotas se guardaron a 4°C. Los animales fueron inyectados de manera i.p. con una única dosis de LPS (10 µg/Kg) dos horas previas al condicionamiento en el diseño experimental de consumo corto de DRG.

Para el tratamiento intrahipocampal se utilizó  $\alpha$ -MSH (agonista de los receptores MC3 y MC4) (NeoMPS, Francia) que fue reconstituida en solución salina estéril y las alícuotas se guardaron a -20°C. Se utilizó solución salina estéril 0,9% (SAL) como control debido a que no se encontraron diferencias a nivel conductual ni molecular cuando se administró salina conteniendo 0,01% de albúmina sérica bovina (ASB). Los animales fueron inyectados bilateralmente en hipocampo dorsal con salina o  $\alpha$ -MSH (0.1 µg/0.25 µl). El tratamiento se administró

inmediatamente después del condicionamiento de la memoria de miedo contextual. Las dosis utilizadas fueron seleccionadas en base a estudios previos y a pruebas realizadas en el laboratorio.

Para la administración de la nanoterapia se utilizó (Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>)- $\alpha$ -MSH (NDP- $\alpha$ -MSH) (BACHEM, California). El NDP- $\alpha$ -MSH fue administrado vía i.p. unido a nanopartículas de quitosano con tween 80% (CHI-Tw-NDP- $\alpha$ -MSH) sintetizadas por la Dra. Onnainty Renée (UNITEFA CONICET/FCQ UNC).

Para el diseño experimental de ingesta corta, cinco días de DRG, dos horas y medias previas al condicionamiento se administró el desafío inmune débil LPS i.p. y media hora posterior a LPS se administraron las nanopartículas (NP) en solución (0.022  $\mu$ g/ $\mu$ l). Se inyectaron 300  $\mu$ l los cuales contenían 6.5  $\mu$ g de NDP- $\alpha$ -MSH (nanopartículas cargadas, NPc). Se utilizó solución de NP sin NDP- $\alpha$ -MSH (nanopartículas vacías, NPv) como control.

Para el diseño experimental de ingesta larga, ocho semanas de DRG, dos horas previas al condicionamiento se administraron NPc (0.022  $\mu$ g/ $\mu$ l), en un volumen de 300  $\mu$ l. Se utilizó solución de NPv como control.

### **DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PERIFÉRICOS**

Al finalizar la ingesta de cinco días de DRG se determinaron los niveles séricos de glucosa, colesterol total y triglicéridos por espectrofotometría, como indicadores de cambios metabólicos inducidos por la DRG.

Para la determinación de glucosa se utilizó el método automático GOD-POD, para colesterol total se utilizó el método automático CHOD-PAP y para triglicéridos GPO-PAP. Todas las cuantificaciones se obtuvieron mediante reacciones enzimáticas realizadas utilizando un analizador automático de espectrofotometría. Las mediciones se realizaron en el laboratorio central del Hospital Italiano de Córdoba.

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Al finalizar los experimentos conductuales, los animales que fueron sacrificados por perfusión bajo el efecto anestésico de Ketamina-Xylazina (55/11 mg/kg de peso, i.p.) y previo al uso de los cortes se evaluó la correcta difusión de la droga en el área CA1 de hipocampo, así como la ausencia de necrosis y/o hemorragias en el sitio de infusión causado por la implantación de la cánula guía. Para visualizar los cortes se empleó una lupa binocular (Arcano). Los datos correspondientes a los animales que presentaron una localización incorrecta de las cánulas o daño tisular fueron excluidos del análisis de resultados. Las imágenes tomadas de los cortes que presentaron una localización correcta de la infusión se tomaron en zonas próximas a la difusión de la droga siempre respetando mantenerse dentro del área CA1 de hipocampo dorsal. A continuación, se representa en láminas del atlas Allen Mouse Brain Atlas and Allen Reference Atlas los sitios de inyección correspondientes a diferentes grupos de animales (**Fig. 11**).



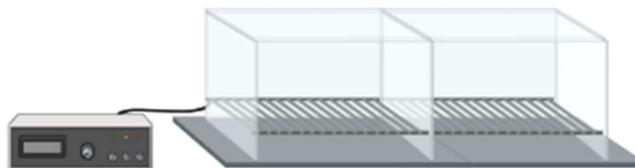
**Figura 11. Cortes histológicos de cerebro de rata con marca representativa del sitio de inyección intrahipocampal en CA1.**

## CONDICIONAMIENTO DE MIEDO CONTEXTUAL

Para estudiar el efecto de la DRG y de los diferentes tratamientos sobre el proceso de consolidación se utilizó el paradigma de condicionamiento de miedo asociado al contexto.

### Aparato de condicionamiento de miedo

El contexto de condicionamiento utilizado fue una caja de acrílico blanco (20 x 23 x 20 cm) con tapa superior transparente, dividida en dos compartimentos iguales. La base de la caja posee una grilla de acero inoxidable que consta de 10 barras paralelas de 4 mm de diámetro. Las barras están conectadas a una fuente de corriente eléctrica que permite la administración de shocks eléctricos en las patas del animal (**Fig. 12**). Para la limpieza de la caja antes y después de cada sesión experimental se utilizó una solución de etanol al 30 %. Este equipo fue colocado en una habitación aislada acústicamente con iluminación (tubo de luz blanca de 30 W) y climatización controlada ( $22 \pm 2$  °C).



**Figura 12. Caja de condicionamiento de miedo.** Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### Sesión de entrenamiento

El día del condicionamiento cada animal fue trasladado a la habitación experimental cubierto por un paño y colocado individualmente en la caja de condicionamiento que corresponde al EC. Luego de 4 min de habituación (período preshock) los animales recibieron 3 shocks eléctricos en las patas (intensidad: 0,55 mA, duración: 3 s, intervalo entre shocks: 30 s), dicho evento aversivo constituye el EI. Los animales permanecieron en el contexto asociado con el shock por 2 min adicionales (período postshock) (**Fig. 13**). Luego fueron

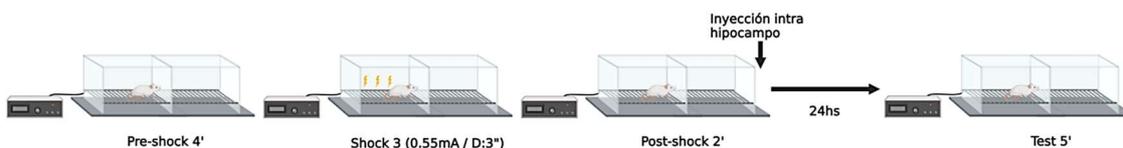
retirados de la caja de condicionamiento e inyectados de manera intra hipocampal con las diferentes drogas. Posteriormente fueron llevados en sus cajas de alojamiento a la habitación de la colonia.

### Sesión de test

24 h posteriores del entrenamiento, los animales fueron expuestos nuevamente al contexto apareado con el shock y se midió la respuesta de miedo durante un periodo de 5 min mediante la utilización de cronómetros (**Fig. 13**). El tiempo total que el animal realiza la conducta de congelamiento en cada periodo (preshock; postshock; test) se cuantificó en segundos y se expresó como porcentaje con relación al tiempo total.

### Evaluación del miedo condicionado

El parámetro utilizado como expresión del comportamiento de miedo en roedores fue la conducta de congelamiento, la cual se define como la adopción de una postura de inmovilidad total en la cual el animal sólo realiza los movimientos asociados a la respiración.



**Figura 13. Esquema del paradigma del condicionamiento de miedo contextual.** Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### DISECCIÓN

Luego de la sesión del test, los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales fueron transferidos individualmente a otra sala e inmediatamente sacrificados por decapitación con guillotina, momento en el cual se obtuvo sangre troncal para la posterior determinación de parámetros metabólicos. Los cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en una matriz de acrílico

(Stoelting CO, USA) sobre hielo. Se realizaron cortes coronales del cerebro de 4 mm de espesor utilizando 2 mm por delante y 2 mm detrás de la marca de la cánula guía y posteriormente se procedió a realizar la disección del hipocampo dorsal (Paxinos, 2007). El tejido extraído fue suficiente para proveer la cantidad de muestra necesaria para determinar los biomarcadores indirectos de estrés oxidativo.

### **DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES INDIRECTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO**

#### **Preparación del homogenato de hipocampo dorsal**

El hipocampo dorsal obtenido mediante disección se homogeneizó en 500  $\mu$ l de PBS 0.1 M diluido 1/30, se centrifugó a 11441 rpm 10 min a 4°C. Se recuperaron 40  $\mu$ l del sobrenadante y se diluyeron en 1160  $\mu$ l de PBS 0.1 M (solución del sobrenadante diluido).

#### **Cuantificación de productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP)**

La determinación de AOPP se basó en la detección espectrofotométrica según (Witko-Sarsat y col., 1996). Se realizó una curva de calibración con 200  $\mu$ l de cloramina T en concentraciones conocidas de 0-100  $\mu$ mol/L, se midieron las absorbancias a 340 nm.

Se cuantificó el contenido total de proteínas del sobrenadante mediante el reactivo de Bradford y posterior detección de la absorbancia a 595 nm. Se utilizaron 200  $\mu$ l de solución del homogenato diluido de cada muestra, los cuales fueron colocados en una placa de microtitulación, se les añadieron 10  $\mu$ l de potasio iodado 1.16 M y 20  $\mu$ l de ácido acético (glacial) e inmediatamente se midió la absorbancia a 340 nm. La concentración de AOPP se expresa en unidades de cloramida T ( $\mu$ mol/L) por miligramo de proteína.

### **Cuantificación del producto derivado de la oxidación lipídica, malondialdehído (MDA)**

Se recuperaron 400µl de homogenato de hipocampo dorsal, se les añadieron 400 µl de una solución de ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético, y se los llevó a baño maría 100°C durante 10 min. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 11441 rpm durante 10 min a 25°C para eliminar del sobrenadante las proteínas desnaturalizadas, se cuantificó inmediatamente la absorbancia a 525 nm. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se cuantificaron utilizando un coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se expresaron como nanomol de malondialdehído por miligramo de proteína. El contenido total de proteínas del sobrenadante se determinó mediante el reactivo de Bradford seguido de la detección de la absorbancia.

### **PERFUSIÓN**

Luego de la sesión del test, los animales fueron anestesiados con Ketamina-xylazina (55/11 mg/kg de peso, i.p.), perfundidos intracardiamente con buffer fosfato (PB) (0.1 M, pH 7.4) frío y luego con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% en PB.

Se extrajeron los cerebros, que fueron utilizados para la evaluación de plasticidad sináptica estructural o para la evaluación de reactividad y proliferación de astrocitos.

### **Preparación de las muestras para evaluación de plasticidad sináptica estructural**

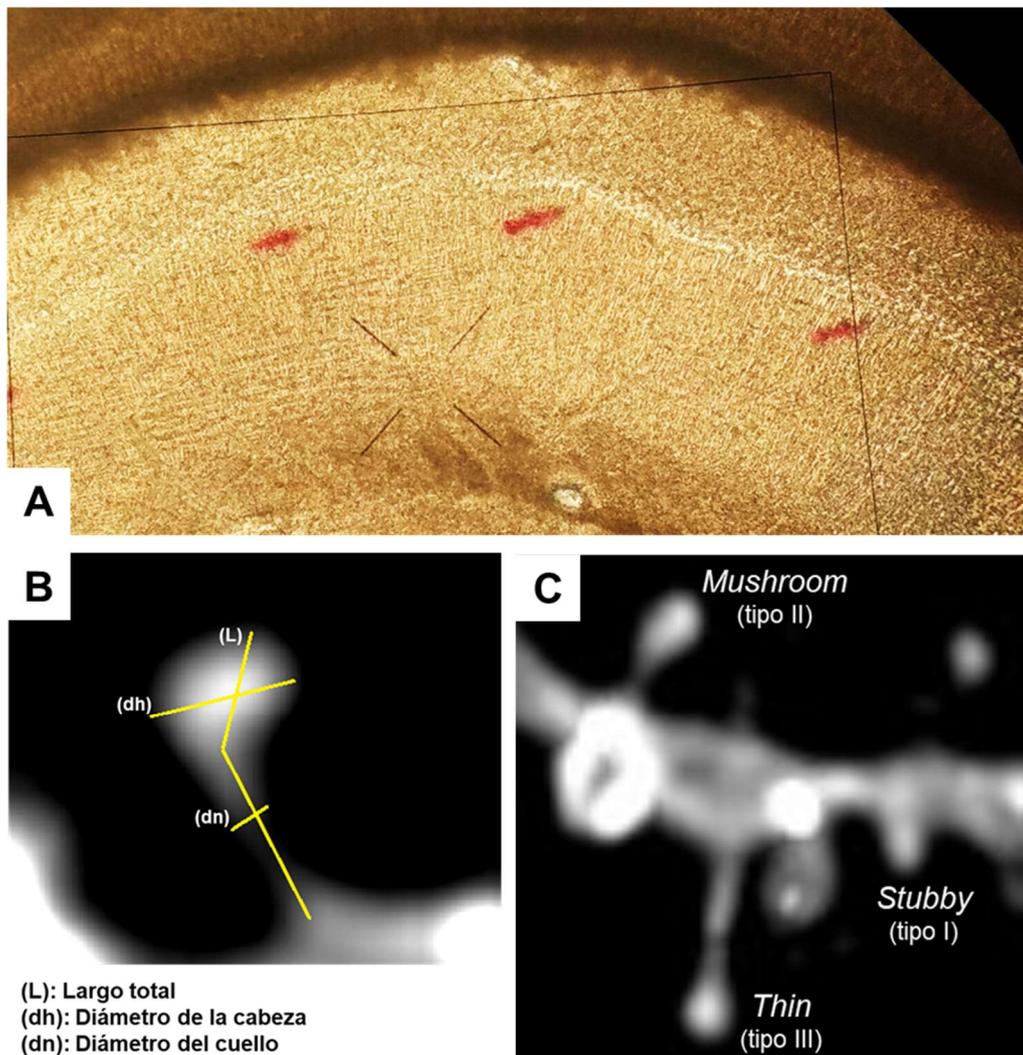
Los cerebros utilizados para determinar cambios en la plasticidad sináptica estructural fueron conservados en PFA 4% a 4°C hasta realizar cortes de 150 µm de espesor utilizando el Vibrátomo Series 1000 semiautomático. Las rebanadas de la región CA1 de hipocampo dorsal obtenidas se conservaron a 4°C en solución de PBS 0.1% y PFA 4%, 50% v/v.

## ANÁLISIS DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA ESTRUCTURAL

Se tomaron al azar rebanadas de hipocampo dorsal de cada grupo experimental. Se tiñó la región de CA1 con pequeñas gotas de una solución saturada del colorante lipofílico 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil indocarbocianina perclorato (Dil, InVitrogen; Carlsbad, CA) suspendido en aceite de pescado (Giachero y col., 2015) (**Fig. 14 A**). Luego, se tomaron imágenes en Z de segmentos dendríticos marcados utilizando un microscopio confocal de barrido laser Olympus - Fluoview FV-1200 con lente objetivo invertido de inmersión en aceite (NA 1,42) (PlanApo) del Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, Córdoba, Argentina.

Las imágenes obtenidas fueron deconvolucionadas utilizando el programa *Huygens Professional* (SVI, Netherlands) ajustado con 15 interacciones, y un subvolumen superpuesto de 10 píxeles. Luego, cada segmento fue analizado manualmente utilizando el software ImageJ. Las proyecciones dendríticas mayores de  $3\mu\text{m}$ , clasificadas como filopodias fueron excluidas (Phillips y Pozzo-Miller, 2014). Se cuantificó el número total de protuberancias en contacto evidente con la dendrita madre. A su vez, se clasificaron los diferentes tipos de espinas como: tipo I o “*stubby*”, tipo II o “*mushroom*” y tipo III o “*thin*” (**Fig. 14 C**). Se consideraron como espinas maduras las espinas *stubby* y *mushroom*. El número total de espinas y el número de cada tipo particular de espinas fueron normalizadas a  $10\mu\text{m}$  de longitud en relación al segmento de la dendrita (Calfa G. y col., 2012; Giachero y col., 2015; Koh y col., 2002).

La clasificación de cada tipo de espinas se realizó según las dimensiones del largo total (L) (desde la base de conexión con la dendrita madre), del diámetro de la cabeza ( $d_h$ ) y del diámetro del cuello ( $d_n$ ) (**Fig. 14 B**). Luego estas medidas se relacionaron de la siguiente manera:  $L/d_n$  y  $d_h/d_n$  (Koh y col., 2002).



**Figura 14.** Imágenes representativas de la metodología utilizada para evaluar la plasticidad sináptica estructural. **A-** Sitios de inyección de Dil en CA1 de hipocampo dorsal. **B-** Medidas tomadas para la clasificación. **C-** Imagen de un fragmento de dendrita con espinas representativas de cada tipo.

### **Preparación de las muestras para evaluación de reactividad y proliferación de astrocitos**

Los cerebros utilizados para determinar cambios en la reactividad y proliferación de astrocitos fueron conservados 24 h en PFA 4% a 4°C y posteriormente en una solución de sucrosa disuelta en PBS 30% hasta que el cerebro decantó completamente dentro del recipiente contenedor. Luego se almacenaron

inmersos en tacos de medio de montaje para congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  (CRYOPLAST, Biopack) hasta ser cortados utilizando el criostato.

Las rebanadas obtenidas del criostato fueron de  $18\mu\text{m}$ , se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Los portaobjetos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la inmunofluorescencia.

### **ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD Y PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS INMUNOFLUORESCENCIA**

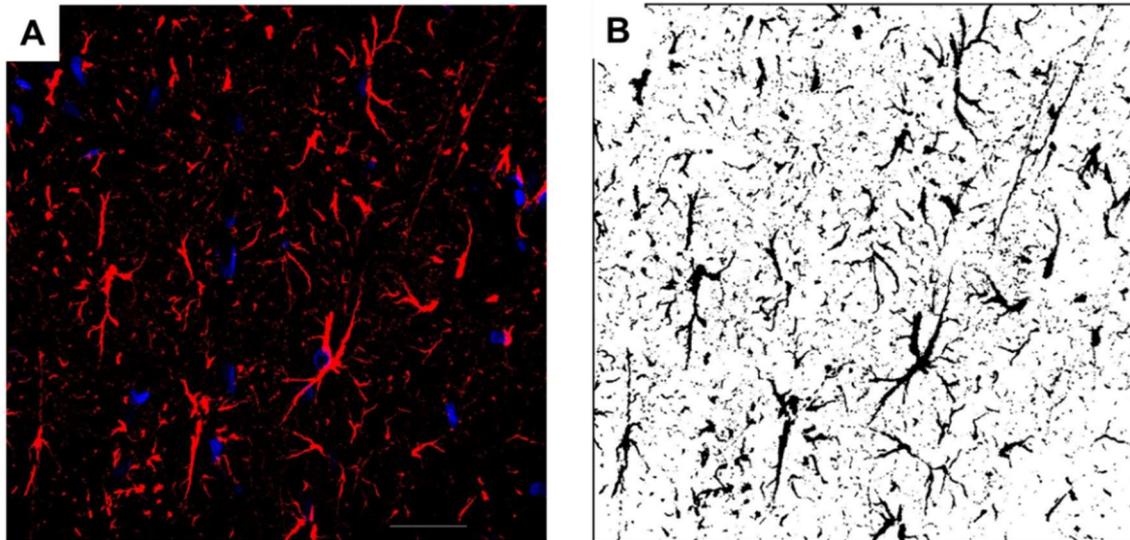
Las rebanadas obtenidas del criostato fueron doblemente marcadas con anticuerpos primarios anti-GFAP y anti-Ki67 de la siguiente manera: primero se realizó una recuperación antigénica con buffer citrato de sodio (pH: 6) 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego, se incubó el tejido con una solución de bloqueo, de suero de cabra 5% durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Se retiró la solución de bloqueo y se incubó durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con anticuerpo primario monoclonal rabbit anti-Ki67 1:250 (Abcam) diluido en PBS 1X y 0.1% Triton X-100. Después de lavar el tejido con PBS 1X se incubó 2hs a TA, con anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG FITC 1:1000 (Jackson ImmunoResearch). Luego se lavó el tejido con PBS 1X y se incubó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con anticuerpo primario monoclonal mouse anti-GFAP 1:300 (MAB360, Millipore) diluido en PBS 1X y 0.1% Triton X-100. Después de lavar el tejido con PBS 1X se incubó 2 h a TA, con anticuerpo secundario donkey anti-mouse 1:1000 (Jackson ImmunoResearch). Por último, los tejidos fueron teñidos con DAPI (1:10.000, Calbiochem) y sellados usando el medio de montaje para resguardar la fluorescencia, Fluor Save (Millipore).

Se tomaron imágenes en Z de la región CA1 de hipocampo dorsal de 60X utilizando un microscopio confocal de barrido laser Olympus - Fluoview FV-1200 con lente objetivo invertido de inmersión en aceite (NA 1,42) (PlanApo) del Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, Córdoba, Argentina.

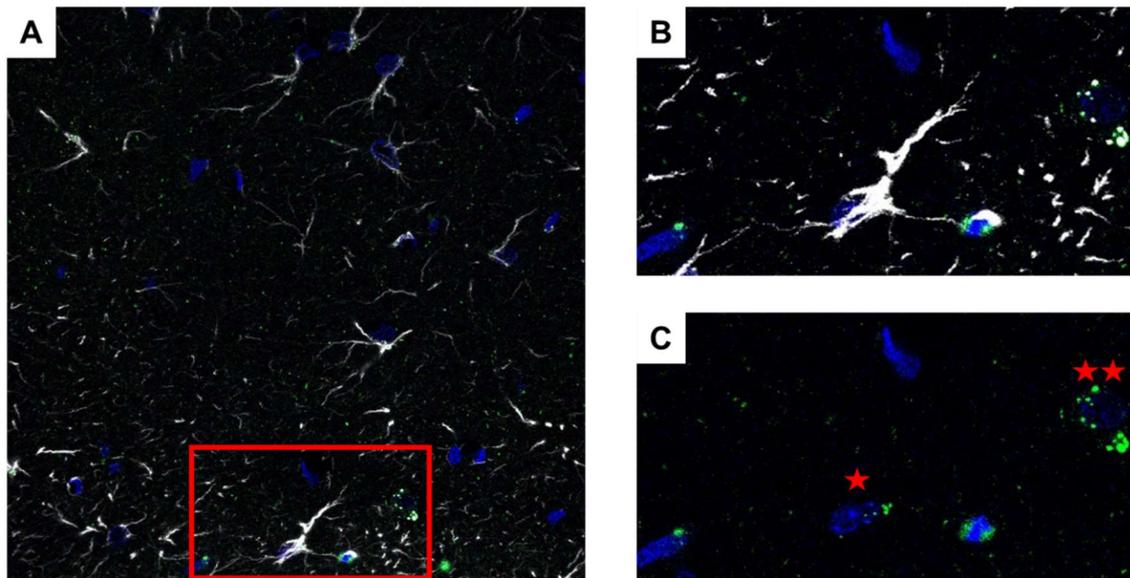
Para determinar la proliferación de astrocitos se cuantificaron las células GFAP+ totales y las células GFAP+/Ki67+ y se expresó el porcentaje de estas últimas referidas al total de células GFAP+ (**Fig 16 A-C**).

Para determinar el porcentaje del área ocupado por GFAP se estableció un umbral de señal positiva que incluyó todos cuerpos y procesos celulares, al

mismo tiempo que excluyó la señal de fondo inespecífica (**Fig. 15 A-B**). Los resultados fueron expresados como el porcentaje medio del área que superó el umbral positivo de todas las imágenes tomadas.



**Figura 15. Imagen representativa del análisis del % de área ocupado por células GFAP+.** **A-** Imagen representativa de CA1 de hipocampo dorsal tomada con el objetivo 60X. Células GFAP+/DAPI. Barra de escala 30 $\mu$ m. **B-** Imagen binaria del campo sobre la cual se eliminó la señal inespecífica de fondo y se determinó el % del área ocupado por la señal que superó el umbral positivo.



**16. Imagen representativa del análisis de células GFAP+/Ki67+.** **A-** Imagen representativa de CA1 de hipocampo dorsal tomada con el objetivo 60X. Células marcadas con GFAP+ (blanco), DAPI (azul) y Ki-67 (verde). Recuadro rojo enmarca célula aislada. **B-** Aumento de célula aislada GFAP+. **C-** Visualización de colocalización. ★ indica célula GFAP+/Ki-67+. ★ ★ indica célula Ki-67+, célula en proliferación diferente de astrocito, no cuantificada.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.). Los resultados de la ganancia de peso fueron analizados utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Los resultados de los parámetros bioquímicos periféricos fueron analizados utilizando el *test t* de Student. El análisis de las espinas dendríticas se realizó utilizando “nested” ANOVA. Los análisis estadísticos restantes se realizaron empleando ANOVA de dos vías. En el caso de la existencia de diferencias significativas, se realizó un *test* de comparación *post hoc* de Newman Keuls. Las diferencias con un valor de  $p \leq 0,05$  fueron consideradas estadísticamente significativas. Los datos se analizaron con el software estadístico STATISTICA.

# RESULTADOS



CAPÍTULO I: Déficit cognitivo inducido por  
una DRG asociada a un estímulo inmune. Rol  
modulador de  $\alpha$ -MSH

El consumo de DRG durante períodos cortos de tiempo es capaz de alterar la homeostasis del organismo tanto en humanos como en roedores, aún antes de observarse signos de obesidad (Campillo y col., 2022; de Paula y col., 2021; Waise y col., 2015). En este contexto, el SI se encuentra sensibilizado y responde de forma exacerbada ante un estímulo débil (Martins y col., 2021). Bajo estas condiciones, se puede producir neuroinflamación, afectando entre otras áreas al hipocampo, el cual tiene un rol importante la formación de memorias contextuales.

Por otra parte, la hormona  $\alpha$ -MSH presenta efectos antiinflamatorios, los cuales ejerce a través de la activación de sus receptores MC3 y MC4 que se expresan predominantemente en el SNC, siendo el área de mayor densidad de expresión el hipocampo (Catania y col., 2004; Chen y col., 2000; Getting y Perretti, 2000). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la administración intrahipocampal de  $\alpha$ -MSH fue capaz de revertir los efectos de IL-1 $\beta$  (citoquina proinflamatoria) sobre la consolidación de una memoria de miedo contextual (Gonzalez y col., 2009, 2013).

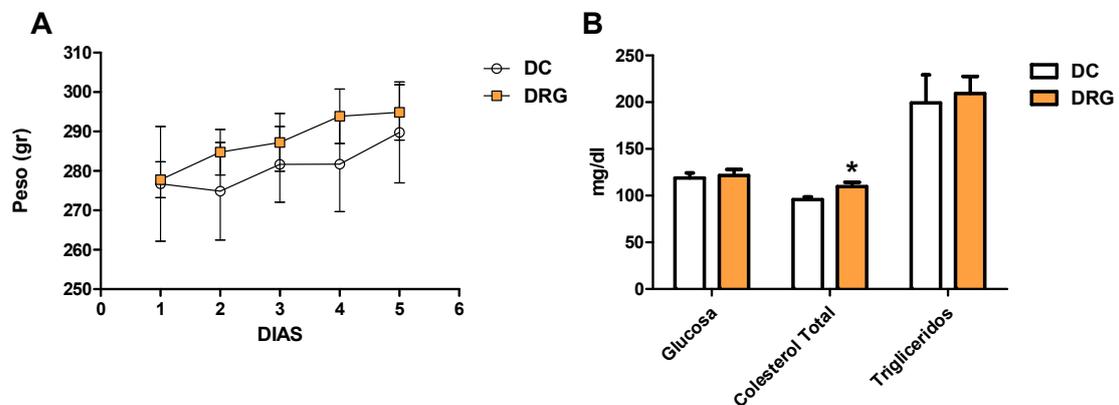
Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, nos propusimos estudiar el efecto de  $\alpha$ -MSH sobre los cambios en una memoria dependiente de hipocampo durante el proceso de consolidación de una memoria de miedo contextual, en animales que recibieron una DRG durante 5 días más un estímulo inmune débil.

#### **1a. Efecto del consumo de una DRG sobre la variación del peso y los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos.**

Ratas macho Wistar de dos meses de edad fueron divididas aleatoriamente en dos grupos para ser alimentadas durante cinco días con dieta control (DC) o dieta rica en grasas (DRG). Durante los cinco días de exposición a las diferentes dietas se realizó el seguimiento de la variación de peso y el día del sacrificio se recolectó suero para la determinación de diferentes parámetros bioquímicos.

El consumo de una DRG durante cinco días no produjo un aumento de peso significativo respecto al consumo de DC (**Fig. 17 A**).

En los animales sometidos a la DRG se observa un aumento significativo de la concentración de colesterol total en plasma, pero no se producen cambios en la concentración de glucosa y triglicéridos (**Fig. 17 B**).



**Figura 17. Efecto del consumo de una DRG durante cinco días sobre el peso y sobre parámetros bioquímicos. A-** Curva de variación de peso. Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. ANOVA de medidas repetidas (n=6 por grupo) **B-** Parámetros bioquímicos. Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. Student's t-test. \*p<0.05 vs. DC. (n=6 por grupo).

El ANOVA de medidas repetidas no mostró diferencias significativas en la variación de peso diario entre ambos tipos de dietas [ $F(5,6)=0.63$ ;  $p=0.68$ ] (**Fig. 17 A**). Por otra parte, el análisis estadístico *Student's t-test* usado para comparar la variación de glucosa, colesterol total y triglicéridos mostró un aumento significativo sólo en los niveles de colesterol total del grupo de animales que consumió DRG comparado con el grupo DC ( $t(10)=-2.52$ ,  $p=0.03$ ,  $d=1.45$ ) (**Fig. 17 B**).

Estos resultados muestran que el consumo de una DRG durante este periodo de tiempo no genera un aumento de peso significativo, ni modifica marcadamente el metabolismo, aunque se observa un aumento del colesterol total.

**Ib. Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre la consolidación de una memoria de miedo contextual en animales que consumieron DRG durante cinco días y recibieron un estímulo inmune débil.**

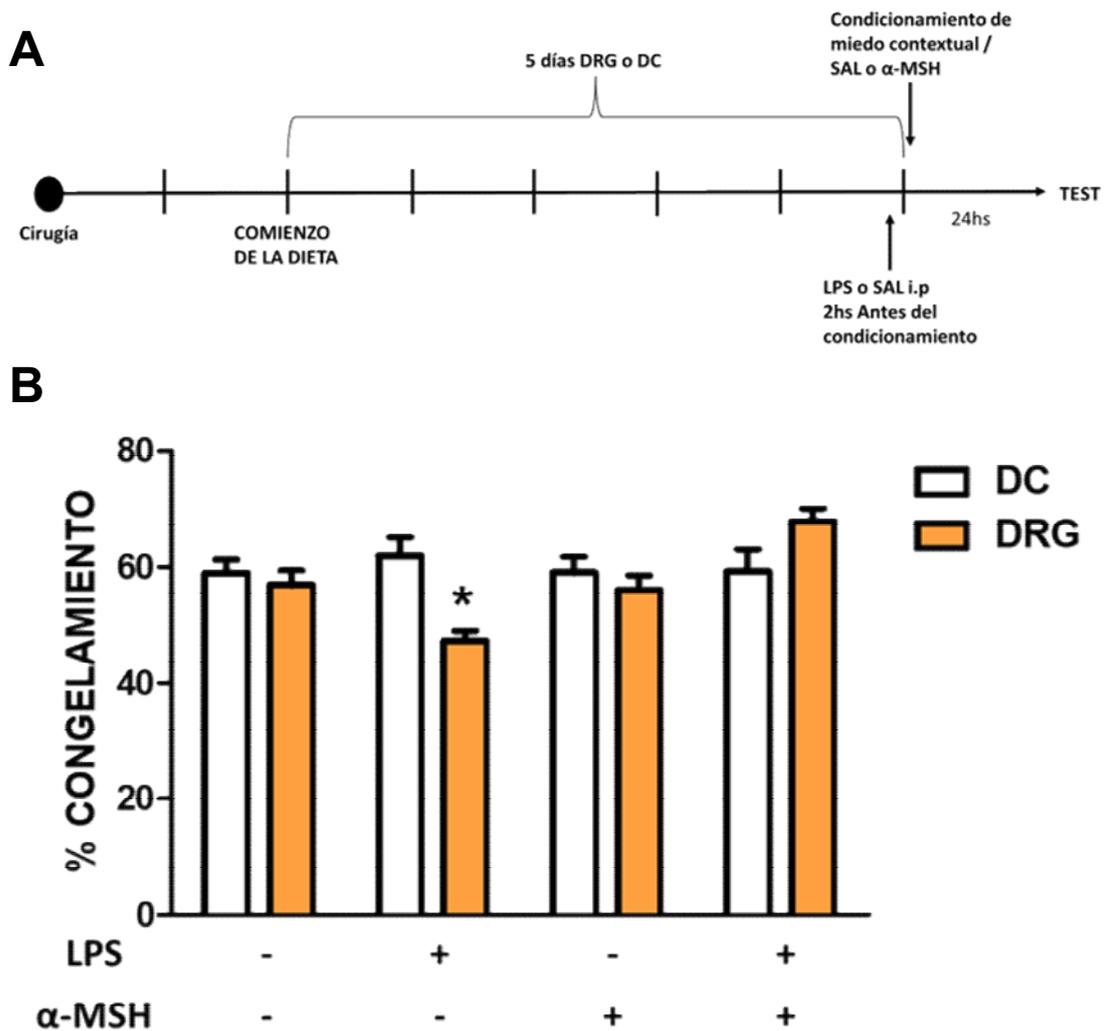
Con el objetivo de determinar el efecto de  $\alpha$ -MSH sobre el deterioro cognitivo en animales que consumieron una DRG asociada a un estímulo inmune débil se realizó un implante bilateral de cánulas guías para llegar hasta la región CA1 de HD, para la posterior microinyección de los tratamientos.

Durante el período de recuperación de la cirugía los animales fueron divididos al azar en dos grupos para ser expuestos a DC o DRG, *ad libitum*, durante cinco días. Dos horas previas al condicionamiento de miedo contextual se les administró una inyección intraperitoneal (i.p.) de LPS (10  $\mu$ g/kg) o SAL. Esta dosis de LPS representa un desafío inmune débil que por sí sólo no desencadena signos ni síntomas asociados a una respuesta inmune. Inmediatamente después del condicionamiento se les administró bilateralmente, en HD,  $\alpha$ -MSH (0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l) o SAL (0.25  $\mu$ l). La expresión de la memoria de miedo se evaluó 24 h después mediante el *test* de reexposición al contexto durante 5 min (**Fig. 18 A**). Los resultados se expresan como el porcentaje de tiempo de congelamiento.

El consumo de DRG durante cinco días no modificó la expresión de la memoria de miedo contextual al ser comparada con el grupo DC. Sin embargo, la ingesta de DRG asociada a un desafío inmune periférico débil (inyección i.p. LPS (10  $\mu$ g/kg)) disminuyó significativamente la expresión de esta memoria al ser comparada con todos los grupos experimentales (**Fig. 18 B**).

Por otra parte, el grupo de animales que fue alimentado con DRG, recibió el desafío inmune y luego del condicionamiento se les inyectó de manera intrahipocampal  $\alpha$ -MSH (0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l bilateralmente) no mostró diferencias significativas en el porcentaje de congelamiento respecto a los grupos experimentales alimentados con DC y al grupo DRG (**Fig. 18 B**).

Los animales alimentados con DC o DRG que fueron tratados con  $\alpha$ -MSH (0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l) no mostraron diferencias significativas respecto a los animales tratados con SAL (**Fig. 18 B**).



**Figura 18.  $\alpha$ -MSH revierte la disminución en la respuesta de miedo contextual inducida por el consumo de una DRG por un periodo corto en combinación con un estímulo inmune débil. A-** Esquema experimental. **B-** Respuesta de congelamiento durante el *test* de 5 minutos. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  E.E.M. del porcentaje de tiempo en que los animales permanecen inmóviles. ANOVA dos vías seguido por *Newman Keuls post-hoc test*. \* $p < 0.05$  DRG-LPS vs. todos los grupos. Tratamientos: LPS (i.p.) 10  $\mu$ g/kg /  $\alpha$ -MSH (intra-HD) 0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l. (n=10-16 ratas por grupo).

El ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo de la dieta [ $F(1,96)=1.77$ ;  $p=0.18$ ]. Sin embargo, reveló un efecto significativo del tratamiento

[ $F(3,96)=3.31$ ;  $p<0.05$ ] y de la interacción entre ambas variables [ $F(3,96)=5.70$ ;  $p<0.01$ ]. El *test* de *Newman Keuls* indica que el porcentaje de congelamiento del grupo que consumió DRG durante cinco días no es estadísticamente diferente del grupo DC ( $p=0.59$ ). La ingesta de DRG asociada a un desafío inmune periférico débil disminuyó significativamente la expresión de la memoria de miedo contextual, al ser comparada con todos los grupos experimentales ( $p<0.05$ ). Por otra parte, el grupo de animales alimentado con DRG más el estímulo inmune que fue tratado con  $\alpha$ -MSH no mostró diferencia significativa en la conducta de congelamiento respecto de los grupos DC y DRG ( $p>0.05$ ).

Los resultados indican que la ingesta de DRG durante un período corto de tiempo no interfiere en la expresión de la memoria de miedo contextual, sin embargo, si se asocia a un desafío inmune débil se evidencia una disminución en la expresión de dicha memoria. Estos resultados confirmarían que la ingesta de DRG produce una sensibilización del SI, que, ante un estímulo posterior puede producir neuroinflamación. El tratamiento con  $\alpha$ -MSH, un neuropéptido con potentes efectos antiinflamatorios revierte este efecto.

CAPÍTULO II: Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre cambios en la plasticidad estructural del hipocampo dorsal durante el proceso de consolidación de una memoria contextual de miedo, en animales expuestos a DRG más un estímulo inmune débil

Durante la ventana temporal del proceso de consolidación de la memoria se desarrollan cambios bioquímicos, moleculares y estructurales. Los cambios estructurales permiten la reorganización de circuitos neuronales con el fin de estabilizar la memoria adquirida, generando una memoria a largo plazo (Dudai, 2002; Kandel, 2001; McGaugh, 2000).

Hemos establecido que la inyección intrahipocampal de IL-1 $\beta$ , un modelo de neuroinflamación aguda, fue capaz de interferir en los cambios estructurales que subyacen al proceso de consolidación de una memoria de miedo contextual. Además, en el mismo modelo experimental, demostramos que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH fue capaz de revertir esta interferencia (Herrera y col., 2019). Estos resultados fueron consistentes con estudios que demuestran que la activación del receptor MC4 en hipocampo favorece la neurotransmisión y plasticidad sináptica (Shen y col., 2013).

Considerando estos antecedentes junto a los mencionados en la introducción, nos propusimos estudiar el efecto de  $\alpha$ -MSH sobre cambios en la densidad total y forma de espinas dendríticas en animales que consumieron la DRG más un estímulo inmune débil.

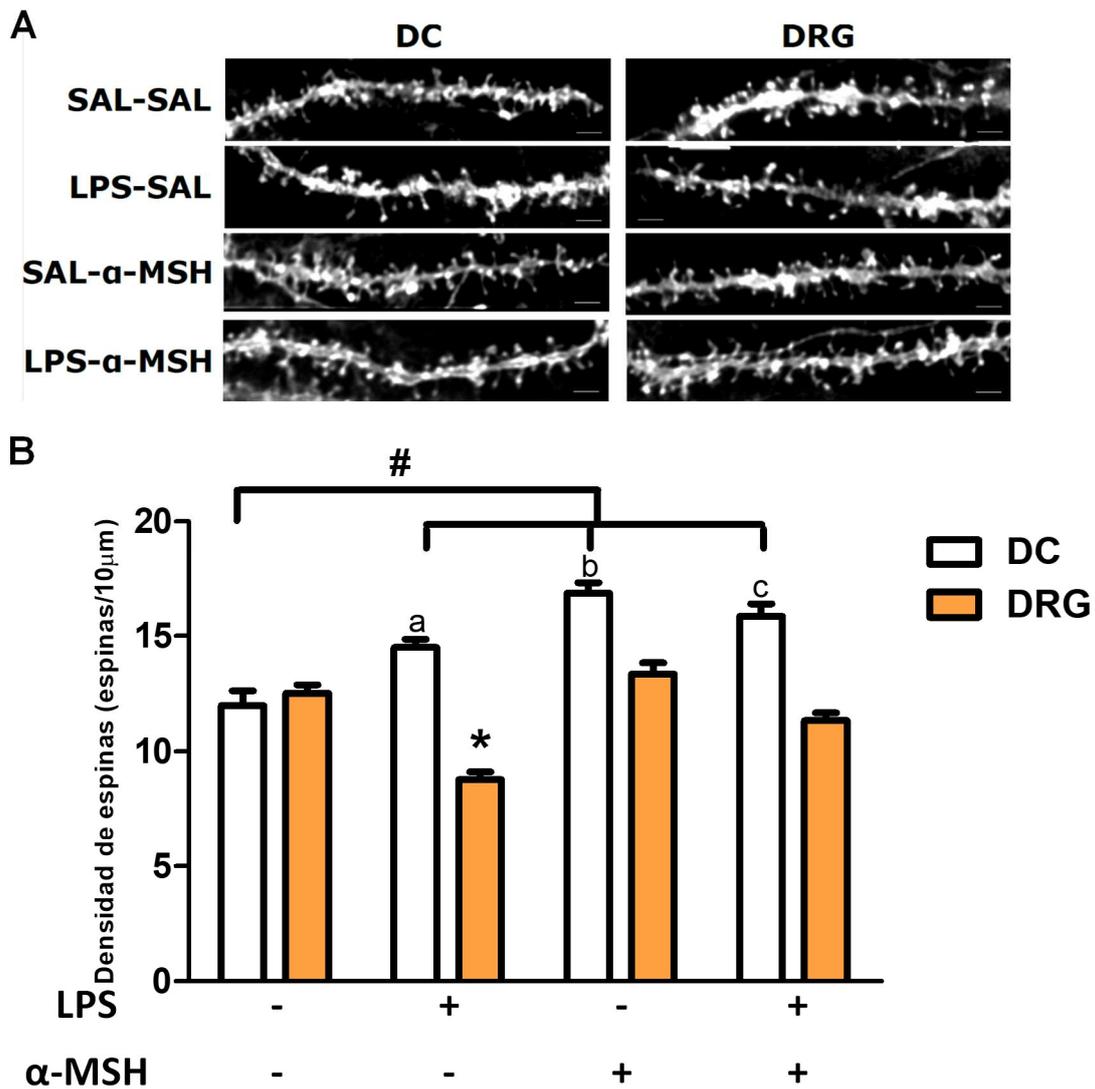
### **Ila. Efecto de $\alpha$ -MSH sobre cambios en la densidad total de espinas dendríticas en hipocampo dorsal inducidos por el consumo de una DRG asociada a un estímulo inmune débil.**

Los animales fueron sacrificados por perfusión intracardiaca inmediatamente después del test conductual y se extrajo el cerebro, del cual se obtuvieron rebanadas de HD. Posteriormente se realizó la técnica de tinción con Dil en la región CA1 de HD y se tomaron fotografías con el microscopio confocal FV 1200. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ y los valores de las espinas fueron normalizados cada 10  $\mu$ m.

El grupo de animales alimentados con DRG que recibió el desafío inmune débil mostró una disminución significativa de la densidad total de espinas dendríticas en área CA1 de hipocampo dorsal respecto a todos los grupos experimentales.

No se observó una diferencia significativa en la densidad de espinas dendríticas entre los animales que consumieron DC y DRG (**Fig. 19 B**).

El tratamiento intrahipocampal con  $\alpha$ -MSH aumentó la densidad de espinas dendríticas en los animales que recibieron DRG asociada a LPS, siendo la densidad de las mismas similar a los grupos DC y DRG (**Fig. 19 B**).



**Figura 19. Efecto de  $\alpha$ -MSH en los cambios inducidos por el consumo de una DRG más LPS sobre la densidad total de espinas dendríticas. A-** Imágenes representativas de los grupos DC y DRG asociados a los diferentes tratamientos. Barra de escala representa 2  $\mu$ m. **B-** Densidad total de espinas dendríticas. Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. Nested ANOVA seguido por Newman Keuls post-hoc test. \* $p < 0.001$  DRG-LPS vs. todos los grupos. # $p < 0.001$  DC vs. DC asociada a LPS,  $\alpha$ -MSH y LPS- $\alpha$ -MSH. <sup>a,b,c</sup> $p < 0.001$ , a vs. DRG-LPS, b vs. DRG- $\alpha$ -MSH y c vs. DRG-LPS- $\alpha$ -MSH. Tratamientos: LPS (i.p.) 10  $\mu$ g/kg /  $\alpha$ -MSH (intra-HD) 0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l. (n= 2-4 ratas, 600-800 $\mu$ m longitud total).

El Nested ANOVA indicó un efecto del tratamiento sobre la densidad total de las espinas dendríticas [ $F(7,140)=38.79$ ;  $p<0.05$ ]. El *test a posteriori Newman Keus* no mostró diferencia significativa entre los grupos DC y DRG, mientras que en el grupo de animales alimentados con DRG que recibió el desafío inmune débil disminuyó significativamente la densidad total de espinas dendríticas ( $p<0.001$ ) respecto a todos los grupos experimentales (**Fig. 19 B**). Por otra parte, el grupo de animales expuestos a DRG más LPS, que además recibió el tratamiento con  $\alpha$ -MSH no mostró diferencias significativas respecto a los grupos DC ( $p=0.28$ ) y DRG ( $p=0.13$ ) (**Fig. 19 B**).

Por otra parte, el análisis *a posteriori Newman Keus* también mostró que  $\alpha$ -MSH, en la dosis utilizada, produjo un incremento en la densidad de espinas dendríticas en animales que recibieron DC, asociada o no a LPS ( $p<0.05$ ); también se observó un aumento en la densidad de espinas en los animales que recibieron DC más LPS ( $p<0.05$ ), comparados con el grupo DC. Además, este análisis demostró un incremento en los grupos DC-LPS, DC-  $\alpha$ -MSH y DC-LPS- $\alpha$ -MSH respecto a los grupos bajo los mismos tratamientos alimentados con DRG (**Fig. 19 B**).

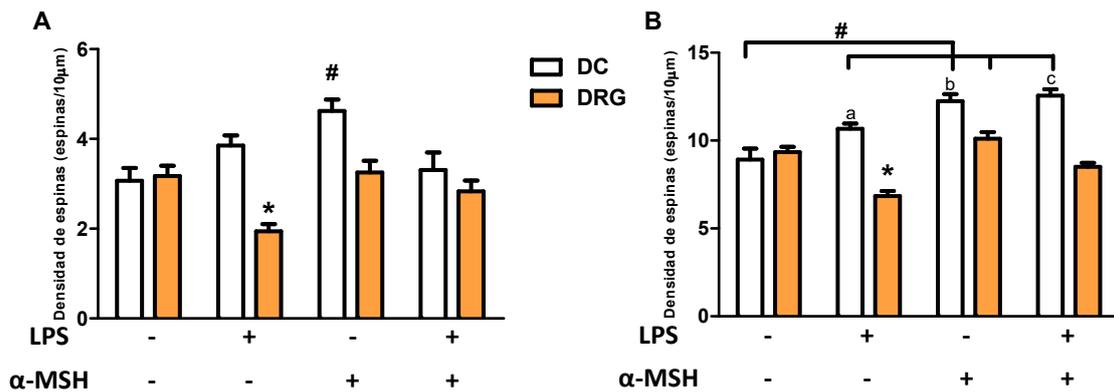
Estos resultados sugieren que  $\alpha$ -MSH es capaz de modular los cambios en la plasticidad sináptica estructural observados en los animales alimentados con DRG asociada a un estímulo inmune débil.

### **IIb. Efecto de $\alpha$ -MSH sobre cambios en la densidad de espinas finas y maduras en hipocampo dorsal inducidos por el consumo de una DRG asociada a un estímulo inmune débil.**

Posteriormente analizamos si este efecto en la densidad total estaba asociado a cambios en algún tipo particular de espinas. Las espinas dendríticas se clasificaron en: maduras (tipo *stubby* y *mashroom*) y finas (tipo *thin*) según la relación entre las siguientes longitudes: largo total, largo del cuello y diámetro de la cabeza de cada una, según Koh y col., 2002.

Los resultados mostraron que la disminución de la densidad total de espinas del grupo de los animales alimentados con DRG más LPS está asociada a la disminución tanto de la densidad de espinas finas como de espinas maduras

(Fig. 20 A-B). Por otro lado, y en consistencia con lo observado en la densidad total de espinas, los grupos DC y DRG no fueron diferentes entre sí al comparar la densidad de ambos tipos de espinas (Fig. 20 A-B). Además, la densidad de ambos tipos de espinas en los animales alimentados con DRG más el estímulo inmune débil que recibieron tratamiento con  $\alpha$ -MSH no fue diferente de los grupos DC y DRG (Fig. 20 A-B).



**Figura 20. Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre los cambios inducidos por el consumo de una DRG más LPS sobre la densidad de distintos tipos de espinas dendríticas. A-** Densidad de espinas finas. **B-** Densidad de espinas maduras. Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. Nested ANOVA seguido por Newman Keuls post-hoc test. **A-** \*p<0.05 DRG-LPS vs. todos los grupos. #p<0.05 DC- $\alpha$ -MSH vs. todos los grupos. **B-** \*p<0.001 DRG-LPS vs. todos los grupos. #p<0.01 DC vs. DC asociada a LPS,  $\alpha$ -MSH y LPS- $\alpha$ -MSH. <sup>a,b,c</sup>p<0.001; a vs. DRG-LPS, b vs. DRG- $\alpha$ -MSH y c vs. DRG-LPS- $\alpha$ -MSH. Tratamientos: LPS (i.p.) 10  $\mu$ g/kg /  $\alpha$ -MSH (intra-HD) 0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l. (n= 2-4 ratas, 600-800 $\mu$ m longitud total).

El Nested ANOVA indicó un efecto del tratamiento sobre la densidad de ambos tipos de espinas, finas [F(7,140)=9.96; p<0.05] y maduras [F(7,140)=31.78; p<0.05].

En relación a las espinas finas, en el análisis a *posteriori* Newman-Keuls, los grupos DC y DRG no mostraron ser diferentes (p=0.77). El grupo expuesto a DRG-LPS mostró una disminución significativa de la densidad de espinas finas

respecto a todos los grupos ( $p < 0.05$ ). Asimismo, el análisis estadístico reveló que el grupo DRG-LPS tratado posteriormente con  $\alpha$ -MSH no fue diferente a los grupos DC ( $p = 0.51$ ) y DRG ( $p = 0.61$ ) (**Fig. 20 A**).

Por otro lado, el *test a posteriori Newman-Keuls* mostró un aumento significativo de la densidad de espinas finas del grupo DC- $\alpha$ -MSH respecto de todos los grupos ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 20 A**).

En cuanto al *test a posteriori Newman-Keuls* realizado para analizar el efecto en la densidad de espinas maduras, no se observaron diferencias significativas entre los grupos DC y DRG ( $p = 0.39$ ). Al igual que en la densidad de espinas finas, el grupo DRG-LPS disminuyó significativamente respecto de todos los grupos ( $p < 0.001$ ) y el grupo DRG-LPS más el tratamiento con  $\alpha$ -MSH no fue diferente de los grupos DC ( $p = 0.39$ ) y DRG ( $p = 0.19$ ) (**Fig. 20 B**).

Por otra parte, en el análisis *a posteriori Newman Keus* también se observó un incremento significativo en la densidad de espinas maduras de los grupos DC-LPS, DC- $\alpha$ -MSH, DRG- $\alpha$ -MSH y DC-LPS- $\alpha$ -MSH respecto al grupo DC sin tratamiento asociado ( $p < 0.01$ ) (**Fig. 20 B**). El aumento en la densidad de espinas maduras de los grupos DC-LPS, DC- $\alpha$ -MSH y DC-LPS- $\alpha$ -MSH también fue significativo respecto a los mismos tratamientos alimentados con DRG ( $p < 0.001$ ) (**Fig. 20 B**). Este efecto incidió en la densidad total de espinas dendríticas, aunque no modificó la expresión de la memoria de miedo contextual.

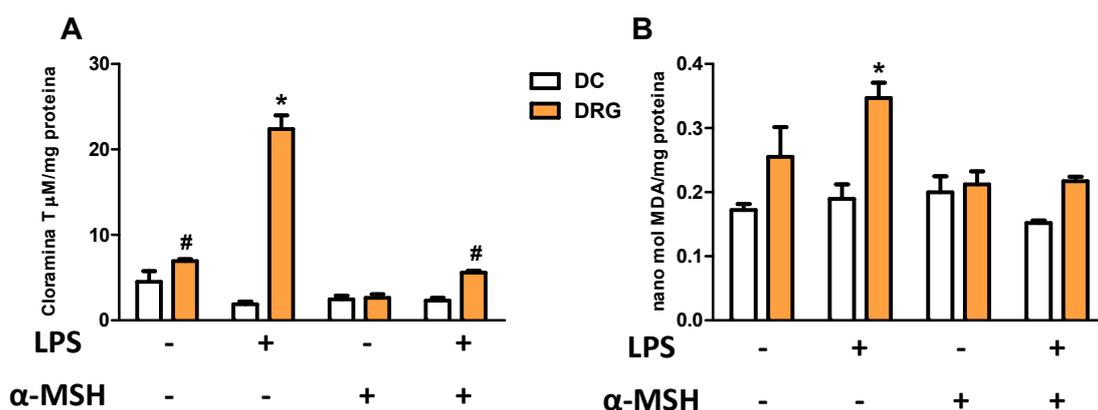
Estos resultados sugieren que la disminución observada en la expresión de la memoria de miedo contextual del grupo de animales DRG-LPS puede estar relacionada a cambios en la plasticidad sináptica estructural, debidos a una disminución de la densidad total de espinas dendríticas a expensas de ambos tipos de espinas (maduras y finas). El tratamiento con  $\alpha$ -MSH es capaz de modular este efecto.

CAPÍTULO III: Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre el  
estrés oxidativo en animales que recibieron una  
DRG durante cinco días más un estímulo  
inmune débil

Las alteraciones conductuales y estructurales encontradas en los animales que recibieron DRG y LPS podrían estar asociadas a un proceso neuroinflamatorio. Este proceso, en primera instancia, es una respuesta fisiopatológica que tiene como fin reparar y eliminar los daños ocasionados en el microambiente neuronal (Jaganjac y col., 2022). Sin embargo, cuando esta condición inflamatoria es difícil de revertir se asocia a un incremento de ERO y en consecuencia el sistema antioxidante no es capaz de eliminarlas, lo que lleva a un aumento del estrés oxidativo. Las ERO presentan una gran inestabilidad y reaccionan con diferentes macromoléculas de los tejidos como lípidos, proteínas y ADN. Los productos de estas reacciones tienen mayor estabilidad (horas a semanas de vida media) por lo que son utilizados como marcadores indirectos del estrés oxidativo (Ogundele y col., 2014) .

Nos propusimos determinar si nuestro modelo experimental se asocia a un aumento del estrés oxidativo; para lo cual se realizó la cuantificación de los productos de las interacciones de las ERO con proteínas (productos proteicos de oxidación avanzada - AOPP) y lípidos (malondialdehído - MDA) en homogenatos de HD. Además, evaluamos si el tratamiento con  $\alpha$ -MSH tiene efecto sobre los posibles cambios en el estrés oxidativo.

Los resultados mostraron un significativo aumento de AOPP y MDA en el grupo de animales alimentados con DRG más el estímulo inmune débil con LPS (**Fig. 21 A-B**) lo que indica un incremento del estrés oxidativo en HD. En el grupo de animales que consumió DRG no se evidenció un aumento significativo de AOPP y MDA al ser comparado con el grupo alimentado con DC (**Fig. 21 A-B**). Por otro lado, el grupo experimental DRG más LPS asociado al tratamiento intrahipocámpal con  $\alpha$ -MSH mostró niveles de AOPP y MDA similares a los grupos DC y DRG (**Fig. 21 A-B**).



**Figura 21. Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre el aumento de los marcadores indirectos de estrés oxidativo inducido por el consumo de una DRG más LPS. A-** Productos avanzados de la oxidación proteica (AOPP). **B-** Producto derivado de la oxidación lipídica (MDA). Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. ANOVA de dos vías seguido por Newman Keuls post-hoc test. **A**- \* $p < 0.001$  DRG-LPS vs. todos los grupos. # $p < 0.05$  DRG y DRG-LPS- $\alpha$ -MSH vs. DC-LPS, DC- $\alpha$ -MSH, DC-LPS- $\alpha$ -MSH y DRG- $\alpha$ -MSH. **B**- \* $p < 0.05$  DRG-LPS vs. todos los grupos. Tratamientos: LPS (i.p.) 10  $\mu$ g/kg /  $\alpha$ -MSH (intra-HD) 0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l. (n=4 ratas por grupo).

El ANOVA de dos vías realizado para el análisis de AOPP indicó un efecto significativo de la dieta [F(1,24)=144.44;  $p < 0.05$ ], del tratamiento [F(3,24)=59.70;  $p < 0.05$ ] y una interacción significativa entre la dieta y el tratamiento [F(3,24)=72.81;  $p < 0.05$ ]. El *post hoc Newman Keuls* no reveló diferencias significativas entre los grupos DC y DRG ( $p = 0.09$ ). No obstante, los animales alimentados con DRG que recibieron LPS i.p. mostraron un incremento significativo respecto a todos los grupos experimentales ( $p < 0.001$ ). Además, el *test Newman Keuls* mostró que el grupo DRG-LPS con el posterior tratamiento con  $\alpha$ -MSH no fue diferente de los grupos DC ( $p = 0.34$ ) y DRG ( $p = 0.22$ ) (**Fig. 21 A**).

En este análisis también se observó un leve incremento, aunque significativo de AOPP en los grupos DRG y DRG-LPS- $\alpha$ -MSH respecto a los grupos DC bajo los diferentes tratamientos y DRG- $\alpha$ -MSH ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 21 A**).

Por otra parte, el ANOVA de dos vías para el análisis de MDA mostró un efecto significativo de la dieta [ $F(1,24)=23.01$ ;  $p<0.05$ ], del tratamiento [ $F(3,24)=4.60$ ;  $p<0.05$ ] y una interacción significativa entre la dieta y el tratamiento [ $F(3,24)=3.28$ ;  $p<0.05$ ]. El test a *posteriori* Newman-Keuls no mostró diferencias significativas entre los grupos DC y DRG ( $p=0.16$ ). El grupo DRG-LPS mostró un aumento significativo de MDA respecto de todos los grupos ( $p<0.05$ ). Por otra parte, se observó que el grupo DRG-LPS- $\alpha$ -MSH no fue diferente respecto de los grupos alimentados con DC, asociados o no a los diferentes tratamientos y tampoco respecto a los grupos DRG y DRG- $\alpha$ -MSH ( $p>0.05$ ) (**Fig. 21 B**).

Estos resultados demuestran un incremento en el estrés oxidativo que se asocia a un contexto inflamatorio, inducido por el consumo de una DRG más un desafío inmune débil. Los resultados son consistentes con los efectos observados en el *test* conductual y en los cambios de la plasticidad sináptica estructural. El tratamiento con  $\alpha$ -MSH fue capaz de revertir este efecto.

CAPÍTULO IV: Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre la reactividad de astrocitos hipocampales en animales que recibieron una DRG durante cinco días más un estímulo inmune débil

Los astrocitos, células gliales, participan activamente en diferentes procesos como la actividad sináptica, el balance homeostático del microambiente neuronal y la respuesta ante agentes patógenos (Sanmarco y col., 2021).

Dentro de sus funciones se ha demostrado que ejercen un papel dual en la mantención del equilibrio redox: por un lado, pueden secretar agentes antioxidantes, pero, por otra parte, en un ambiente neuroinflamatorio generan un exceso de ERO.

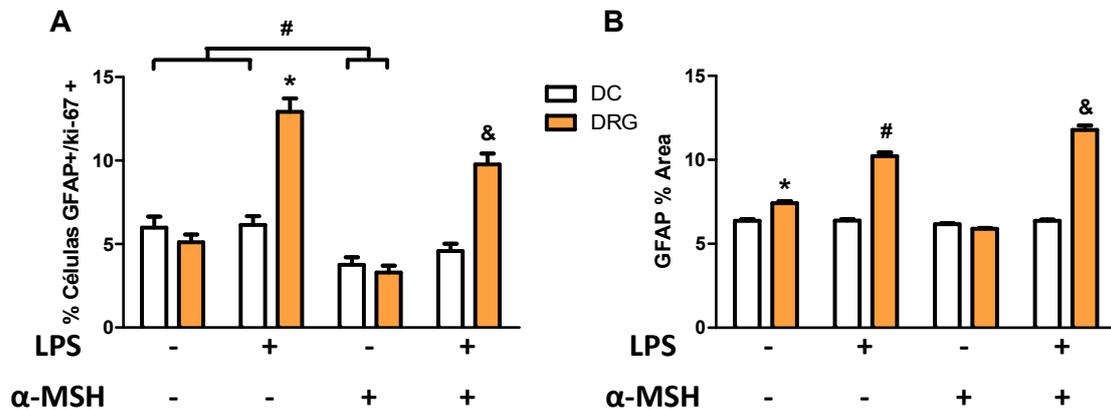
La respuesta de los astrocitos en un microambiente inflamatorio está asociada a cambios moleculares, funcionales y morfológicos que son ampliamente utilizados como indicadores que permiten determinar la reactividad astrocitaria.

Por lo cual, nos propusimos evaluar este fenómeno en nuestro modelo experimental. Para este fin, analizamos cambios en porcentaje de área ocupado por GFAP y cambios en la proliferación de astrocitos (Ki-67) en la región CA1 de hipocampo dorsal mediante la metodología de inmunofluorescencia. El porcentaje de GFAP se determinó como la relación del área inmunorreactiva respecto del área total examinada. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal FV 1200 y posteriormente fueron analizadas con el software ImageJ.

La proliferación de astrocitos fue cuantificada como el porcentaje de células GFAP+ que colocalizan con el marcador de proliferación celular Ki-67+ (**Fig. 22 A**). Los resultados mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células GFAP+/Ki-67+ del grupo DRG-LPS respecto a todos los grupos experimentales. Al comparar el porcentaje de células GFAP+/Ki-67+ de los grupos DC y DRG no se encontraron diferencias significativas entre sí. En el grupo DRG-LPS más la inyección intrahipocampal de  $\alpha$ -MSH este porcentaje fue significativamente menor respecto del grupo DRG-LPS, aunque esta disminución no fue suficiente para reestablecer valores comparables con los grupos DC y DRG (**Fig. 22 A**).

Los resultados obtenidos con relación al porcentaje de área ocupado por GFAP mostraron que el consumo de DRG es capaz de aumentar significativamente el % de GFAP respecto del grupo DC. Por otra parte, el análisis estadístico mostró

que el grupo alimentado con DRG asociado al estímulo inmune débil incrementó aún más este % de área ocupado por GFAP. De manera interesante, este análisis también reveló un aumento del % de GFAP en el grupo DRG-LPS- $\alpha$ -MSH, que fue significativamente mayor a todos los grupos experimentales (**Fig. 22 B**).



**Figura 22. Efecto de  $\alpha$ -MSH sobre cambios en la proliferación y el % de área ocupado por GFAP de astrocitos hipocámpales. A-** Porcentaje de células GFAP+/Ki-67+. **B-** Porcentaje de área ocupado por GFAP. Todas las imágenes fueron tomadas en la región CA1 de hipocampo dorsal. Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. ANOVA de dos vías seguido por Newman Keuls post-hoc test. **A-** \* $p < 0.001$  DRG-LPS vs. todos los grupos.  $\gamma p < 0.001$  DRG-LPS- $\alpha$ -MSH vs DC, DC-LPS, DC- $\alpha$ -MSH, DC-LPS- $\alpha$ -MSH, DRG y DRG- $\alpha$ -MSH. # $p < 0.05$  DC- $\alpha$ -MSH y DRG- $\alpha$ -MSH vs. DC y DC-LPS. **B-** \* $p < 0.001$  DRG vs. todos los grupos. # $p < 0.001$  DRG-LPS vs. todos los grupos.  $\gamma p < 0.001$  DRG-LPS- $\alpha$ -MSH vs. todos los grupos. Tratamientos: LPS (i.p.) 10  $\mu$ g/kg /  $\alpha$ -MSH (intra-HD) 0.1  $\mu$ g/0.25  $\mu$ l. (n=3 ratas por grupo, 6 rebanadas de 18  $\mu$ m por rata, 16 imágenes por rebanada).

El ANOVA de dos vías realizado para el análisis de la proliferación de astrocitos mostró un efecto significativo de la dieta [ $F(1,1999)=39.50$ ;  $p < 0.05$ ], del tratamiento [ $F(3,1999)=45.44$ ;  $p < 0.05$ ] y una interacción significativa entre la dieta y el tratamiento [ $F(3,1999)=25.25$ ;  $p < 0.05$ ]. El *post hoc Newman-Keuls* no reveló diferencias significativas entre los grupos DC y DRG ( $p=0.38$ ). Sin embargo, sí mostró un incremento significativo del grupo experimental alimentado con DRG que recibió el estímulo inmune, LPS, en relación con todos

los demás grupos experimentales ( $p < 0.001$ ). El grupo DRG-LPS que además recibió el tratamiento con  $\alpha$ -MSH intrahipocampal mostró una proliferación significativamente menor respecto del grupo DRG-LPS aunque la proliferación continuó siendo significativamente mayor respecto de los grupos DC asociada a todos los tratamientos y a los grupos que recibieron DRG y DRG- $\alpha$ -MSH ( $p < 0.001$ ) (**Fig. 22 A**).

Además, el análisis *post hoc* mostró que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH en los animales expuestos a ambas dietas (DC- $\alpha$ -MSH y DRG- $\alpha$ -MSH) disminuyó la colocación de células GFAP+/Ki-67+ respecto de los grupos DC y DC-LPS ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 22 A**).

El análisis estadístico del % de área ocupado por GFAP mediante el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la dieta [ $F(1,1886)=562.38$ ;  $p < 0.05$ ], del tratamiento [ $F(3,1886)=205.27$ ;  $p < 0.05$ ] y una interacción significativa entre la dieta y el tratamiento [ $F(3,1886)=188.10$ ;  $p < 0.05$ ]. El *test a posteriori Newman-Keuls* reveló un aumento significativo del porcentaje de área ocupado por GFAP del grupo DRG respecto de los grupos alimentados con DC ( $p < 0.001$ ). Además, el análisis estadístico mostró un incremento de este porcentaje del grupo DRG-LPS respecto a todos los grupos DC y a los grupos DRG y DRG- $\alpha$ -MSH ( $p < 0.001$ ). Por otra parte, el grupo DRG-LPS- $\alpha$ -MSH mostró un incremento del porcentaje de área ocupado por GFAP estadísticamente mayor con relación a todos los grupos experimentales ( $p < 0.001$ ) (**Fig. 22 B**).

Estos resultados sugieren que la DRG asociada al estímulo inmune es capaz de aumentar la proliferación y el porcentaje de GFAP. El tratamiento con  $\alpha$ -MSH fue capaz de atenuar la proliferación de los astrocitos. Mientras que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH aumentó el porcentaje de GFAP.

CAPÍTULO V: Eficacia de una nanoterapia  
con NDP-MSH en el déficit cognitivo asociado  
al consumo de DRG

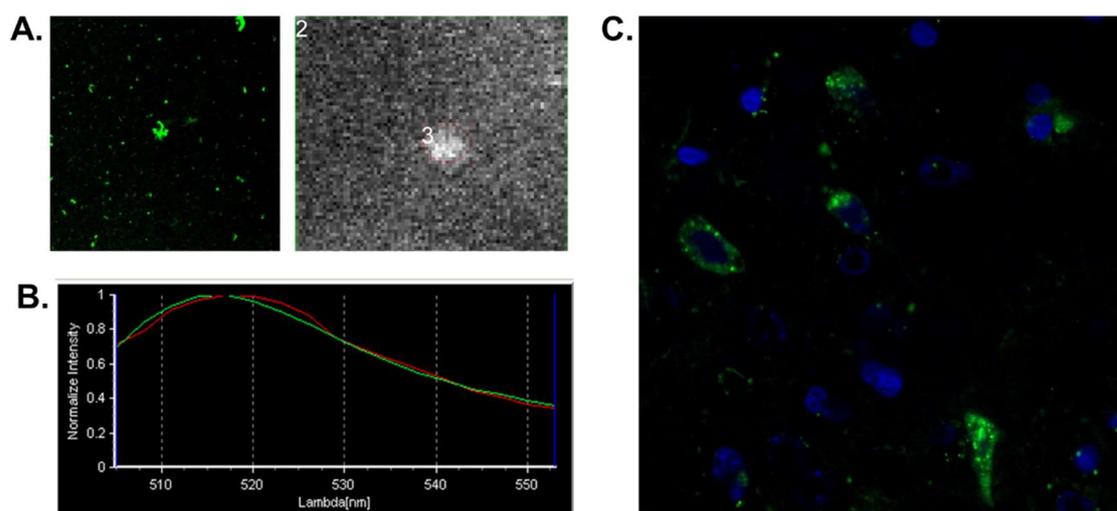
El conocimiento de los mecanismos asociados a las secuelas cognitivas ocasionadas por el consumo de DRG y las posibles vías de modulación por  $\alpha$ -MSH nos indujo a buscar nuevos métodos terapéuticos. Con este propósito, se evaluó si los cambios cognitivos descritos previamente pueden ser modificados mediante una terapia con NP como medio de transporte de NDP-MSH.

NDP-MSH es un análogo de  $\alpha$ -MSH que presenta estabilidad ante la degradación enzimática, aumentando así su biodisponibilidad. Además, presenta alta afinidad por los receptores MC4.

#### **Va. Determinación de la capacidad de las NP para llegar a hipocampo dorsal, región CA1.**

Previo a los experimentos conductuales se evaluó la capacidad de las NP para atravesar la BHE y llegar al HD. Se inyectaron por vía i.p. 300 $\mu$ l de una solución de NP marcadas con el fluorescente FITC (NP-FITC), y luego de 2 h se realizó una perfusión intracardiaca y se extrajo el cerebro.

Se obtuvieron rodajas del cerebro para luego tomar imágenes del HD en el microscopio confocal FV 1200 (**Fig. 23**). Las imágenes obtenidas nos permitieron verificar que las NP fueron capaces de atravesar la BHE.



**Figura 23. NP-FITC en hipocampo dorsal región CA1.** **A-** NP-FITC en solución (derecha). Selección de una NP (izquierda). **B-** Gráfico de emisión de fluorescencia para FITC estándar (línea verde) y emisión de la solución de NP-FITC (línea roja). **C-** Células de HD CA1 con presencia de NP-FITC. Núcleos celulares marcados con DAPI (azul). Imágenes 20X - zoom 2.5X. Microscopio confocal FV 1200.

**Vb. Eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH en el déficit cognitivo asociado al consumo de DRG por un periodo corto (5 días) más un estímulo inmune débil.**

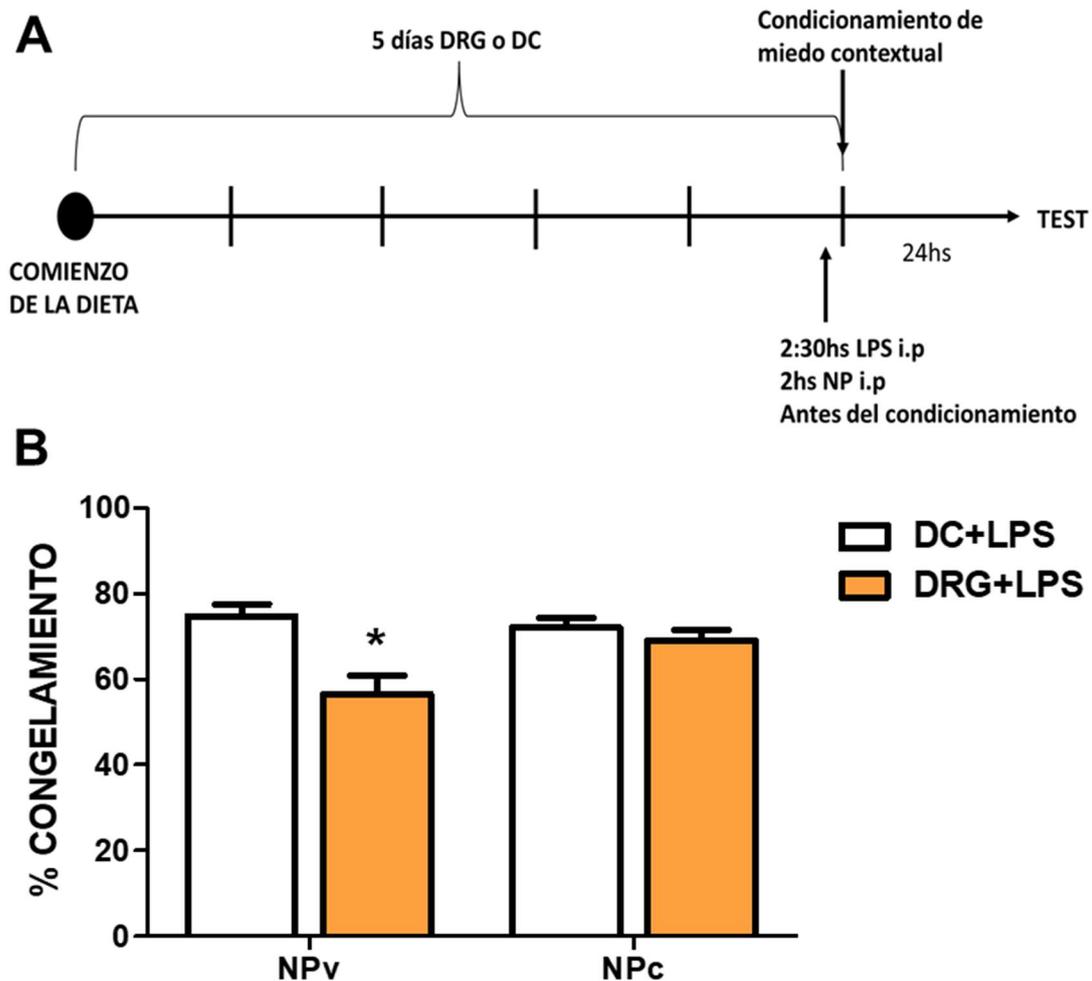
Se sintetizaron nanopartículas de quitosano recubiertas de tween y cargadas con NDP-MSH para ser administradas vía intraperitoneal.

Los animales alimentados con DC o DRG durante cinco días recibieron una inyección i.p. de LPS (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o vehículo 2:30 h previas al condicionamiento. El tratamiento con NP vacías (NPv) o cargadas con NDP-MSH (NPc: 300  $\mu\text{l}$  de una solución de NDP-MSH 0.022  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .) fue administrado i.p 2 h previas al condicionamiento de miedo contextual y 24 h posteriores se realizó el test de memoria de miedo condicionada al contexto (**Fig. 24 A**).

Los resultados mostraron nuevamente que el consumo de la DRG durante cinco días asociada al estímulo inmune débil con LPS interfirió en la expresión de la memoria de miedo contextual disminuyéndola de manera significativa respecto

al grupo que consumió DC, también asociada al desafío inmune con LPS (**Fig. 24 B**). Estos resultados confirman los resultados previos (**ver Fig. 18 B**).

El empleo de la nanoterapia con NDP-MSH en el grupo DRG+LPS logró revertir la disminución en la expresión de la memoria de miedo, ya que no fue significativamente diferente del grupo DC+LPS. Por otra parte, los resultados también muestran que la dosis utilizada de nanopartículas no interfiere en la expresión de la memoria de miedo contextual ya que el grupo DC+LPS-NPc no mostró diferencias estadísticamente significativas en el *test* conductual respecto del grupo DC+LPS-NPv (**Fig. 24 B**).



**Figura 24.** La nanoterapia con NDP-MSH revierte la disminución de la respuesta de miedo contextual inducida por el consumo de una DRG por un periodo corto más un estímulo inmune débil. **A-** Esquema experimental. **B-** Respuesta de congelamiento durante el *test* de 5 minutos. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  E.E.M. del porcentaje de tiempo en que los animales permanecen inmóviles. ANOVA dos vías seguido por *Newman Keuls post-hoc test*. \* $p < 0.05$  DRG-LPS -NPv vs. todos los grupos. (n= 7/9 ratas por grupo).

El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de la dieta [ $F(1,29)=10.97$ ;  $p < 0.05$ ], no reveló un efecto significativo del tratamiento [ $F(1,29)=2.36$ ;  $p = 0.14$ ]. La interacción entre la dieta x tratamiento mostró tener efecto significativo [ $F(1,29)=5.66$ ;  $p < 0.05$ ]. El *test Newman-Keuls* reveló una disminución significativa en el porcentaje de congelamiento del grupo DRG-LPS tratado con

NP vacías respecto a todos los grupos ( $p < 0.05$ ]). El *test Newman-Keuls* no mostró diferencia entre los grupos DC-LPS tratados con NP vacías y cargadas ( $p = 0.55$ ). El grupo DRG-LPS que fue tratado con NP cargadas con NDP-MSH no fue diferente de DC-LPS, tratados con NP vacías o cargadas ( $p > 0.05$ ) (**Fig. 24 B**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con NP conteniendo NDP-MSH es eficaz de revertir el deterioro cognitivo observado en el grupo alimentado con DRG más el estímulo inmune débil.

CAPÍTULO VI: Eficacia de una nanoterapia  
con NDP-MSH en el déficit cognitivo asociado  
al consumo de DRG por un periodo prolongado  
(8 semanas)

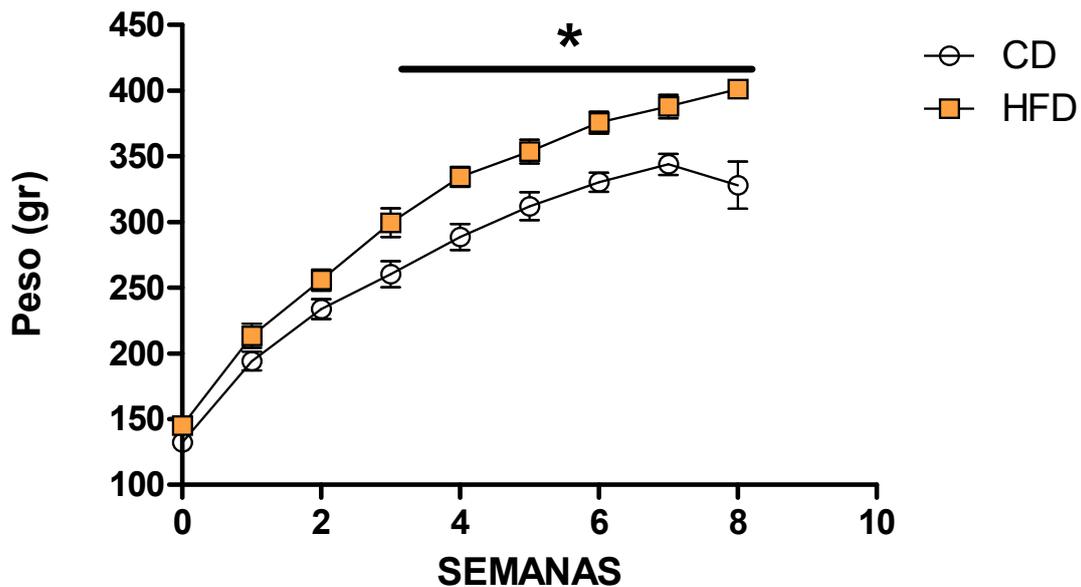
Como se describió anteriormente, el consumo de DRG durante un tiempo prolongado lleva al organismo a un estado de inflamación crónica de baja intensidad que por diferentes vías de comunicación entre la periferia y el sistema nervioso central afecta la homeostasis cerebral causando deterioro cognitivo.

Nos propusimos evaluar si el tratamiento con nanoterapia con NDP-MSH es capaz de revertir los efectos cognitivos del consumo de DRG durante 8 semanas.

**Via. Impacto del consumo de DRG sobre la variación del peso.**

Ratas macho Wistar de 45 días de edad fueron divididas aleatoriamente en dos grupos para ser alimentadas durante 8 semanas con DC o DRG.

Durante la exposición a las diferentes dietas se realizó el seguimiento de la variación de peso de manera semanal. Se observó una diferencia significativa entre los grupos a partir de la tercera semana de ingesta de las dietas, siendo superior el peso del grupo de animales alimentados con DRG **(Fig. 25)**.



**Figura 25. Efecto del consumo de DRG durante 8 semanas sobre el peso.** Curva de variación de peso. Los resultados se representan como la Media  $\pm$  E.E.M. ANOVA de medidas repetidas seguido de Newman-Keuls test. \* $p < 0.05$ . (n=10 ratas por grupo).

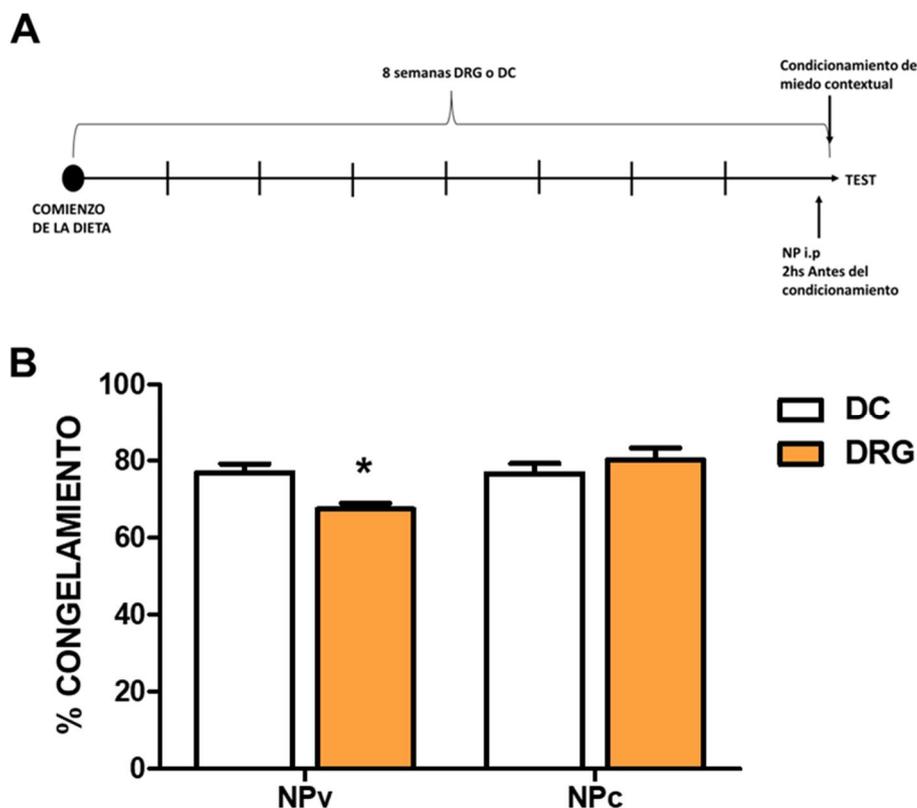
El ANOVA de muestras repetidas mostró un efecto de la dieta [F(9,2)=63.01;  $p < 0.05$ ]. El *test a posteriori Newman-Keuls* reveló una diferencia significativa a partir de la tercera semana del consumo de las dietas ( $p < 0.05$ ) (Fig. 25).

#### **Vib. Eficacia de una nanoterapia con NDP-MSH sobre el deterioro cognitivo asociado al consumo de DRG durante 8 semanas.**

Los animales alimentados con DC o DRG durante 8 semanas recibieron el tratamiento con NP vía intraperitoneal. Se les administraron NP vacías (NPv) o cargadas con NDP-MSH (NPc: 300  $\mu$ l de una solución de NDP-MSH 0.022  $\mu$ g/ $\mu$ l i.p.) 2 h previas al condicionamiento de miedo contextual y a las 24 h se realizó el *test* de memoria de miedo condicionada al contexto (Fig. 26 A).

Los resultados mostraron que el consumo de DRG durante un periodo prolongado es capaz de disminuir, de manera significativa, la expresión de la memoria de miedo contextual (**Fig. 26 B**).

El tratamiento con las NP conteniendo NDP-MSH en el grupo DRG logró revertir la disminución en la expresión de la memoria evaluada, ya que no fue diferente del grupo DC. Además, los resultados muestran que la dosis utilizada de nanopartículas cargadas con NDP-MSH no modifica el porcentaje de la conducta de congelamiento, ya que los grupos DC con NPv y NPc no son diferentes entre sí (**Fig. 26 B**).



**Figura 26.** La nanoterapia con NDP-MSH revierte la disminución de la respuesta de miedo contextual inducida por el consumo de una DRG por un periodo prolongado de tiempo. **A-** Esquema experimental. **B-** Respuesta de congelamiento durante el *test* de 5 minutos. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  E.E.M. del porcentaje de tiempo en que los animales permanecen inmóviles. ANOVA dos vías seguido por *Newman Keuls post-hoc test*. \* $p < 0.05$  DRG-NPv vs. todos los grupos. (n=9/12 ratas por grupo).

El ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo de la dieta [ $F(1,38)=1.99$ ;  $p=0.17$ ], reveló un efecto significativo del tratamiento [ $F(1,38)=1.96$ ;  $p<0.05$ ] y un efecto de la interacción entre la dieta x tratamiento [ $F(1,38)=7.34$ ;  $p<0.05$ ]. El *test a posteriori* Newman-Keuls, en concordancia con el capítulo anterior, no mostró diferencias significativas entre los grupos alimentados con DC tratados con NP vacías y cargadas con NDP-MSH ( $p=0.94$ ). Sin embargo, reveló una disminución significativa en la conducta de congelamiento del grupo DRG-NPv respecto a todos los grupos ( $p<0.05$ ). En cuanto al grupo DRG-NPc no fue diferente estadísticamente de los grupos DC tratados tanto con NP vacías, como con NP cargadas ( $p>0.05$ ) (**Fig. 26 B**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con NDP-MSH mediante el uso de nanopartículas es eficaz para atenuar el daño cognitivo observado en los animales alimentados con DRG durante 8 semanas.

# DISCUSIÓN



Teniendo en cuenta el impacto a nivel social, económico y en la salud del sobrepeso y la obesidad, es de interés conocer los cambios fisiológicos que llevan al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. Dentro de este grupo de enfermedades, como consecuencia del sobrepeso y la obesidad, se encuentran el síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo II, hipertensión y la predisposición a la aparición temprana de enfermedades neurodegenerativas.

En la actualidad, existe una tendencia a estilos de vida con preponderancia en el sedentarismo y hábitos alimenticios poco favorables, con gran ingesta de alimentos ultra procesados, los cuales son ricos en hidratos de carbono simples y grasas saturadas. En Argentina, se proyectó un incremento anual de adultos con obesidad, desde 2010 al 2030, del 1.6%. Se estima que para 2030 el porcentaje de adultos con obesidad sea del 35.8%, mientras que el incremento de niños con obesidad desde 2010 a 2030, se estimó en un 2.2%. A su vez, se proyecta hacia el 2030 que, de las muertes prematuras asociadas a enfermedades crónicas no trasmisibles, el 33.3% del total correspondan a comorbilidades asociadas a la obesidad (Barata Cavalcanti y col., 2022).

El consumo de dietas ricas en grasas lleva al aumento del depósito de tejido graso visceral, el cual es capaz de secretar citoquinas proinflamatorias, produciendo así una inflamación periférica crónica de baja intensidad, que a su vez afecta al SNC, favoreciendo el desarrollo de neuroinflamación, deterioro cognitivo, depresión y desordenes de ansiedad. Además, la neuroinflamación contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Flores-Dorantes y col., 2020; Sharma, 2021).

Se ha establecido el efecto en el SNC del consumo de las DRG por periodos prolongados de tiempo tanto en humanos como en roedores. Es conocido que una de las áreas del cerebro más vulnerable al daño inducido por el consumo de DRG es el hipocampo. El hipocampo es una estructura crítica para procesos de aprendizaje y memoria, por los que su deterioro puede observarse en etapas tempranas de varias enfermedades neurodegenerativas (Lama y col., 2021; Leigh Gibson y col., 2013; Olsthoorn y col., 2021).

Numerosas investigaciones evalúan el efecto en el SNC del consumo de DRG durante periodos prolongados de tiempo. Sin embargo, existe poca evidencia en

modelos de consumo de DRG por periodos cortos de tiempo, de los cuales se muestran sólo efectos aislados (Attuquayefio y col., 2017; Baym y col., 2014; de Paula y col., 2021; Leigh Gibson y col., 2013). Los efectos en el SNC del consumo de DRG durante periodos cortos de tiempo (3, 5 y hasta 7 días) han sido demostrados incluso mucho antes de la ocurrencia de signos de alteraciones metabólicas y obesidad (Beilharz y col., 2014). Sin embargo, los mecanismos por los cuales periodos tan cortos de ingesta de DRG afectan al SNC no son muy claros todavía.

Ha sido demostrado previamente que el consumo de DRG por periodos cortos de tiempo es capaz de sensibilizar el SI, el cual ante un estrés o un estímulo inmune débil produce una respuesta exacerbada. En este contexto el SNC se encuentra afectado y a su vez se producen deterioros funcionales en diversas áreas, siendo una de las más vulnerables el hipocampo (Kanoski y Davidson, 2011; Sobesky y col., 2016).

En el presente trabajo de tesis doctoral nos interesó evaluar el efecto en el SNC del consumo de DRG por un periodo corto de tiempo. Utilizamos un modelo de ingesta de DRG por 5 días, asociada a un estímulo inmune débil con LPS. Nos enfocamos específicamente en un proceso cognitivo dependiente de hipocampo, la consolidación de una memoria de miedo contextual. Nos propusimos determinar el efecto de este tipo de alimentación en etapas tempranas del consumo y los mecanismos involucrados. Determinamos además el efecto de  $\alpha$ -MSH, un neuropéptido de probado efecto antiinflamatorio y neuroprotector.

Durante el tiempo de exposición a la DRG y DC se realizó el seguimiento en el incremento de peso de los grupos experimentales, sin encontrar diferencias significativas al comparar ambos grupos. Además, se determinaron diferentes parámetros periféricos al finalizar el periodo de la ingesta de ambas dietas. Las concentraciones de glucosa y triglicéridos no fueron diferentes entre ambos grupos, mientras que el nivel de colesterol total fue mayor en el grupo de animales alimentado con DRG en comparación al grupo alimentado con DC. Estos resultados sugieren que el consumo de DRG con el presente diseño experimental no genera alteraciones consistentes con síndrome metabólico. Sin embargo, el aumento observado en el colesterol total puede estar asociado a cambios en la expresión de proteínas hepáticas claves en el metabolismo del

mismo, induciendo de esta manera su aumento a nivel plasmático, como ha sido demostrado previamente en animales sometidos a una DRG durante 14 días (Magri-Tomaz y col., 2018).

Para evaluar el deterioro en la expresión de una memoria de miedo contextual dependiente de hipocampo, se midió la conducta de congelamiento de los diferentes grupos experimentales. Los resultados demuestran que la ingesta de DRG por sí sola no produce alteraciones en la expresión de la memoria de miedo contextual respecto del grupo control. La ingesta de DRG asociada a LPS disminuye la expresión de esta memoria respecto de los grupos DC y DRG.

Por otro lado, los resultados muestran que la dosis de LPS utilizada no produce cambios en la memoria en los animales que recibieron la DC. Esta dosis fue seleccionada en base a investigaciones publicadas, donde demostraron que no induce fiebre u otros síntomas inflamatorios severos (Johnson y col., 2002; Sobesky y col., 2016).

Estos resultados avalan la hipótesis de que el consumo de una DRG durante un periodo corto sensibiliza al SI, que responde en forma aumentada ante un estímulo inmune e induce neuroinflamación.

Con el fin de determinar el efecto de  $\alpha$ -MSH sobre los cambios en la expresión de la memoria de miedo contextual observados en el grupo experimental DRG-LPS, se administró  $\alpha$ -MSH intrahipocampal. Al evaluar la expresión de la memoria, los resultados revelaron que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH revierte el efecto de la DRG asociada al estímulo inmune con LPS. Además, demuestran que  $\alpha$ -MSH en ausencia de estímulos inflamatorios no produce modificaciones en esta memoria dependiente de hipocampo.

Numerosas evidencias comprueban que el consumo de DRG por periodos prolongados de tiempo produce deterioro en las funciones cognitivas. Se han empleado diferentes *test* conductuales como laberinto acuático de Morris, laberinto de agua de brazos radiales, alternancia espontánea en laberinto en T o en Y y *test* de evitación para evaluar la memoria espacial, la cual depende de hipocampo. En todos estos modelos experimentales se encontró una asociación entre el consumo de DRG y el deterioro en el desempeño durante las sesiones de *test* de los animales de experimentación, aunque no siempre estos efectos

fueron asociados con un aumento de peso (Abbott y col., 2019; Park y col., 2018).

Por otra parte, existen escasas y controversiales evidencias que demuestran alteraciones conductuales en modelos de ingesta de DRG por periodos cortos de tiempo. En el reciente trabajo publicado por de Paula y col., demuestran que el consumo de DRG interfiere en el *test* de reconocimiento de objeto al tercer día de ingesta (de Paula y col., 2021). Trabajos anteriores muestran que durante este tiempo de ingesta de DRG no se observa deterioro en el aprendizaje de memorias dependientes de hipocampo. Sin embargo, sí observan el deterioro cognitivo cuando asocian el consumo de la dieta a un estímulo inmune débil o en animales de experimentación longevos (Sobesky y col., 2016; Spencer y col., 2017). En todos estos reportes determinan que las alteraciones observadas en los *test* conductuales se acompañan del incremento de mediadores inflamatorios, principalmente en el hipocampo.

En nuestro grupo de trabajo se demostró previamente, que la administración de IL-1 $\beta$ , citoquina proinflamatoria, interfiere durante el proceso de consolidación y reconsolidación de una memoria de miedo contextual en un modelo *in vivo*. Asimismo, se observó que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH fue eficaz para revertir el efecto de IL-1 $\beta$  (Gonzalez y col., 2009; Machado y col., 2010). En el presente trabajo, se probó el efecto neuroprotector de  $\alpha$ -MSH, ya que fue capaz de revertir de manera significativa el deterioro causado por la ingesta de DRG más LPS sobre la consolidación de la memoria de miedo contextual evaluada.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación, particularmente enfocados en el efecto de IL-1 $\beta$  durante el proceso de consolidación de una memoria de miedo contextual, han revelado que esta citoquina interfiere a nivel presináptico disminuyendo la liberación de glutamato, mediante la vía de activación de la MAPK p38. También se determinó cuáles son las posibles vías por las que IL-1 $\beta$  afecta el proceso de consolidación a nivel postsináptico. Se observó que IL-1 $\beta$  retarda de manera temporal la activación de ERK2, el cual estimula la transcripción génica de BDNF, que también se encontró disminuido en presencia de IL-1 $\beta$ . Asimismo, se determinó el efecto de  $\alpha$ -MSH posterior a la administración de IL-1 $\beta$ . Los resultados mostraron que la melanocortina,

restablece los niveles de fosforilación de ERK2 y los niveles de la proteína BDNF (Gonzalez y col., 2013, 2009).

Las evidencias mencionadas anteriormente, junto al conocimiento del rol de la activación de las vías de señalización que llevan en última instancia a la síntesis de proteínas como BDNF, implicadas en los cambios estructurales claves para el almacenamiento de una memoria, nos llevaron a investigar si IL-1 $\beta$  interfiere en las modificaciones de la plasticidad sináptica estructural que subyacen al proceso de consolidación de una memoria de miedo contextual. Los resultados obtenidos del análisis de la densidad total de espinas dendríticas de neuronas piramidales de hipocampo demostraron que el tratamiento con IL-1 $\beta$  disminuye dicha densidad a expensas de la disminución en la densidad de espinas maduras, que son las de mayor actividad sináptica. La posterior administración de  $\alpha$ -MSH fue capaz de atenuar este efecto (Herrera y col., 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes respecto a los efectos de  $\alpha$ -MSH en un contexto neuroinflamatorio, inducido por la administración de IL-1 $\beta$ , es probable que este neuropéptido revierta el efecto de la ingesta de una DRG más un estímulo inmune sobre la expresión de una memoria de miedo contextual mediante mecanismos similares.

Como mencionamos anteriormente durante el proceso de consolidación de una memoria es crítica la regulación de los cambios bioquímicos, moleculares y estructurales que subyacen a la formación de los procesos sinápticos excitatorios estables.

A continuación, evaluamos si el déficit en la expresión de la memoria de miedo contextual observado en el presente modelo experimental (consumo de DRG más un estímulo inmune débil con LPS) está asociado a cambios en la plasticidad sináptica estructural. Los resultados nos muestran que la DRG por sí sola no afecta la densidad total de espinas dendríticas, sin embargo, al estar asociada al estímulo inmune se observa una disminución significativa de esta densidad respecto de todos los grupos experimentales. Al clasificar los diferentes tipos de espinas observamos una disminución tanto en la densidad de espinas maduras como de espinas finas.

Al analizar si el tratamiento con  $\alpha$ -MSH interfiere en los cambios estructurales ocasionados por la DRG más LPS, observamos un aumento de la densidad total de espinas dendríticas a expensas de ambos tipos de espinas, maduras y finas. Los cambios observados en el número y forma de espinas dendríticas son consistentes con los resultados del *test* conductual.

Además, observamos un aumento significativo de la densidad de espinas maduras en los animales que recibieron DC y el tratamiento de LPS respecto a los grupos DC y DRG. Este efecto podría estar asociado a un aumento moderado de citoquinas inflamatorias en el SNC, ya que se ha descrito que IL-1 $\beta$  e IL-2, en bajas concentraciones, favorecen la actividad sináptica (Alves y col., 2017; Goshen y col., 2007). Por otra parte, la dosis de  $\alpha$ -MSH empleada produjo un incremento significativo en la densidad de espinas maduras en el grupo de animales alimentado con DC. Se ha demostrado en modelos *in vitro* de neuronas de hipocampo que la estimulación de los MC4R postsinápticos favorecen tanto la plasticidad sináptica estructural (aumento de espinas maduras) como la plasticidad sináptica funcional (facilitación de LTP). Esta evidencia indica la importante participación del receptor en la regulación de la plasticidad sináptica excitatoria (Shen y col., 2013), lo cual es consistente con el efecto de  $\alpha$ -MSH observado en el presente modelo *in vivo*. Sin embargo, este aumento de la plasticidad sináptica estructural si bien fue significativo, no fue suficiente para producir cambios en la expresión de la memoria en los animales alimentados con DC.

Una de las metodologías que se utiliza para determinar la plasticidad sináptica funcional, la cual está correlacionada con el número y la fuerza de conexiones sinápticas, son los registros de LTP. Los cambios observados en la plasticidad sináptica estructural se correlacionan con antecedentes que describen el efecto del consumo de DRG en registros de LTP. Diferentes modelos de animales expuestos al consumo de DRG, ya sea en modelos de consumo prolongado en animales jóvenes o longevos, como en animales expuestos a periodos cortos de tiempo, revelaron una reducción de los registros de LTP en hipocampo, Además, demostraron que esta disminución del LTP se asoció a un déficit en la expresión del receptor TrkB (receptor de BDNF) y de la proteína PSD-95, proteína

postsináptica esencial en la maduración de sinapsis excitatoria (Crispino y col., 2020; Davis y col., 2021; Paulo y col., 2021; Ramírez y col., 2022).

Por otro lado, el efecto modulador de  $\alpha$ -MSH observado en el presente modelo experimental podría estar asociado a la activación de su receptor MC4, presente en la región postsináptica. Está demostrado que la activación de MC4R estimula la inserción de receptores AMPA y en consecuencia facilita la generación de LTP e incrementa la fuerza sináptica. Además, se describió que la activación de MC4R en un modelo de ratón con EA es capaz de atenuar el daño en la plasticidad sináptica (Shen y col., 2013, 2016). Estos antecedentes, son consistentes con resultados previos de nuestro grupo de investigación sobre el efecto modulador de  $\alpha$ -MSH en los cambios de la plasticidad sináptica estructural en un modelo de neuroinflamación aguda (Herrera y col., 2019).

El SNC requiere de gran generación de energía para desarrollar sus funciones, por lo que la actividad durante los procesos de transmisión sináptica presenta una alta demanda de la función mitocondrial. Las mitocondrias son fundamentales para la generación de energía mediante la cadena respiratoria, además, son altamente dinámicas y tienen la capacidad de responder ante cambios en el microambiente celular. Durante los procesos neuroinflamatorios la función metabólica de las mitocondrias se encuentra alterada y en consecuencia se produce un desbalance en la producción de ERO que excede la capacidad antioxidante del SNC, causando daño celular por aumento del estrés oxidativo (Carraro y col., 2018; Cavaliere y col., 2019; Dietrich y col., 2013).

Las ERO son moléculas inestables de vida media muy corta que presentan alta capacidad de reaccionar con macromoléculas presentes en los tejidos como lípidos, proteínas y ADN. Los productos resultantes de estas reacciones son más estables e indicativos indirectos del estado de estrés oxidativo. En el modelo experimental utilizado medimos los niveles de AOPP y MDA. El consumo de DRG durante cinco días no produjo un incremento en los niveles de AOPP o de MDA, respecto al consumo de DC. Sin embargo, al estar asociado al estímulo inmune débil (LPS) los niveles de ambos indicadores fueron significativamente mayores. Por otra parte, este incremento se revirtió en el grupo experimental DRG más LPS, que además fue tratado con  $\alpha$ -MSH. Estos resultados sugieren que el consumo de DRG aumenta la vulnerabilidad del hipocampo a que se

produzca una disfunción mitocondrial, lo cual podría estar reflejado en el desbalance entre la capacidad antioxidativa y oxidativa del SNC. El tratamiento con  $\alpha$ -MSH es capaz de atenuar el efecto de la DRG asociada a LPS.

Se ha demostrado que existen receptores MC4 en células de la glía, particularmente en astrocitos. La activación de estos receptores por  $\alpha$ -MSH, fue capaz de atenuar la producción de iNOS y COX2 en cultivo de astrocitos bajo la estimulación inflamatoria con LPS-IFN- $\gamma$  (Caruso y col., 2007a). Además, se ha demostrado que el ácido palmítico (AP), el ácido graso libre más abundante en alimentos ricos en grasa, produce una respuesta proinflamatoria en astrocitos y microglía. El AP aumenta el daño oxidativo siendo una de las posibles vías de acción la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa ( $\gamma$ -GSH). El tratamiento con NDP- $\alpha$ -MSH demostró favorecer la actividad de SOD e incrementar los niveles de GSH. En el mismo modelo experimental se observó que AP disminuye la expresión de BDNF. El tratamiento con NDP- $\alpha$ -MSH revierte este efecto (Ramírez y col., 2019; Saba y col., 2018). Además, el efecto neuroprotector de  $\alpha$ -MSH se ha demostrado en otros modelos experimentales como el de EA, donde fue capaz de disminuir el nivel de mediadores inflamatorios y apoptóticos y el estrés oxidativo disminuyendo de esta manera la pérdida neuronal. También se observó la reversión del deterioro cognitivo (Giuliani y col., 2014a; Zhang y col., 2014).

Estas evidencias en conjunto sustentan los posibles mecanismos de acción por los cuales  $\alpha$ -MSH ejerce su acción antioxidante, los cuales podrían estar mediando los efectos observados en el presente modelo experimental.

En el proceso de peroxidación lipídica, el radical hidroxilo y el peroxinitrilo reaccionan con los enlaces dobles de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares. Estos productos y las ERO, a su vez modifican las proteínas de tal forma que afectan sus funciones, esto puede resultar en la agregación y entrecruzamiento de proteínas del citoesqueleto que participan en la regulación de la estructura neuronal y el transporte axonal (Mattson y Liu, 2002), con lo cual el estrés oxidativo podría interferir en las modificaciones de la plasticidad sináptica estructural que subyacen al proceso de consolidación de la memoria.

En el hipocampo también se incrementa el estado de estrés oxidativo por causa de la vejez, la exposición a radiación o deficiencia de SOD. Se ha demostrado que estos factores son capaces de afectar la estructura y densidad de las espinas dendríticas. Particularmente, la irradiación en el cráneo es capaz de incrementar el estrés oxidativo y la neuroinflamación llevando a una disminución de espinas maduras y en consecuencia interfiere en la estabilidad y fuerza sináptica (Huang y col., 2015).

Por otra parte, se demostró que la ingesta de DRG por un periodo prolongado de tiempo también fue capaz de incrementar las ERO en hipocampo, este aumento del estrés oxidativo se observó junto a la pérdida del número de espinas dendritas y a una disminución de la sobrevivencia de neuronas (Saiyasit y col., 2020).

Estos antecedentes, junto a los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el desbalance redox es capaz de afectar la plasticidad sináptica estructural y en consecuencia afectar de manera negativa los procesos de aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo.

Los astrocitos forman parte de las células de la glía, y presentan un rol fundamental en la fisiología y en la resolución de procesos patológicos del SNC. Estas células intervienen en diversas funciones desde la sinaptogénesis hasta la regulación del metabolismo neuronal. Mediante su participación en la BHE regulan la comunicación del SNC con la periferia. En condiciones fisiológicas estas células son un componente importante en la sinapsis tripartita, ya que sus proyecciones contactan con las membranas pre y postsináptica, participando de esta manera en la liberación y recaptación de neurotransmisores, en la modulación de la excitabilidad neuronal y de la plasticidad sináptica. Influyendo así en múltiples procesos de aprendizaje y memoria (Sanmarco y col., 2021).

Por otra parte, los astrocitos presentan una población heterogénea dentro del SNC, la cual varía en las diferentes regiones del cerebro e incluso dentro la misma región. Se han descrito diferentes subconjuntos de astrocitos basándose en los diferentes estímulos a los cuales responden, en la morfología y en la expresión de genes. Ante diferentes procesos patológicos los astrocitos responden modificando sus características, esta respuesta se denomina astrogliosis reactiva y también ocurre de manera heterogénea. Diversos estudios

han demostrado que dentro del estado de astrogliosis reactiva existe un subconjunto de astrocitos que expresan moléculas que limitan el proceso inflamatorio (frecuentemente denominados A2), mientras que otro subconjunto expresan moléculas que favorecen la neuroinflamación (frecuentemente denominados A1) (Boghdadi y col., 2020). Los astrocitos desencadenan su polarización al estado reactivo a través de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B la cual es estimulada por la presencia de mediadores inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17), de ERO y de agonistas del receptor Toll-like (Giovannoni y Quintana, 2020; Lee y col., 2022).

Los cambios en la expresión de proteínas que experimentan los astrocitos reactivos son ampliamente utilizados para monitorear la astrogliosis reactiva. El marcador mayormente empleado es la expresión de GFAP. Esta proteína aumenta su expresión en muchos astrocitos ante diferentes estímulos nocivos para el SNC. Sin embargo, no todos experimentan el aumento de GFAP, dando cuenta de la heterogeneidad de la respuesta de los diferentes subconjuntos de astrocitos, que depende de la localización en el SNC, del tipo de injuria que los estimula y de su proximidad a la injuria o lesión. El cambio en la expresión de GFAP, a su vez se acompaña de modificaciones en el volumen (hipertrofia) y número de ramificaciones de los astrocitos. Otro cambio característico que se puede observar en la astrogliosis reactiva es la proliferación de astrocitos. Durante este proceso de proliferación hay un incremento en la proteína nuclear Ki-67, cuya función es regular la proliferación celular, que al ser combinada con la inmunomarcación de células GFAP+ aporta una herramienta que nos indica el porcentaje de proliferación celular específica de astrocitos (Cui y col., 2011; Lee y col., 2022; Pekny y col., 2014).

Teniendo en cuenta la participación de los astrocitos en la mantención de la homeostasis del SNC y en la resolución de procesos neuroinflamatorios evaluamos cambios en la expresión de GFAP y en la proliferación de los astrocitos presentes en HD.

Los resultados obtenidos en cuanto a la proliferación de astrocitos (células GFAP+/Ki-67+) indican que la DRG por sí sola no induce cambios, sin embargo, cuando la DRG está asociada al estímulo inmune débil la proliferación se incrementa significativamente. Por otra parte, al evaluar esta característica en el

grupo experimental alimentado con DRG más el estímulo inmune y el tratamiento con  $\alpha$ -MSH se observó una disminución significativa en la proliferación de astrocitos respecto del grupo DRG-LPS, aunque no fue suficiente para restablecer los valores de los grupos controles.

El efecto de  $\alpha$ -MSH en la activación y proliferación de astrocitos también se ha demostrado en un modelo de isquemia cerebral, el cual induce neuroinflamación. En este modelo se observó una reducción de la proliferación de astrocitos y de GFAP luego del tratamiento con  $\alpha$ -MSH. Cabe destacar que, esta acción neuroprotectora fue observada empleando un tratamiento con inyecciones i.p. de  $\alpha$ -MSH (0.5 mg/kg) 30 min posteriores a la inducción de la isquemia cerebral, seguida de inyecciones diarias durante cuatro días consecutivos (Forslin Aronsson y col., 2006).

En cuanto al porcentaje de área ocupado por GFAP, pudimos observar que el consumo de la DRG durante los cinco días fue suficiente para aumentar dicha área, respecto al consumo de DC. Además, el consumo de DRG asociado al desafío inmune, incrementó aún más el área ocupada por GFAP. En el grupo DRG-LPS tratado con  $\alpha$ -MSH también se observó un incremento significativo del porcentaje de área ocupado por GFAP.

Los cambios observados en las características que indican astrogliosis reactiva, por un lado, nos dan cuenta de la heterogeneidad en la respuesta de los astrocitos ya que el grupo DRG no presentó modificaciones en la proliferación, sin embargo, demostró un aumento en la expresión de GFAP; por otra parte, los grupos DRG-LPS y DRG-LPS- $\alpha$ -MSH aumentaron tanto la proliferación de astrocitos como el porcentaje de área ocupado por GFAP.

El aumento de GFAP del grupo DRG-LPS podría estar estimulando la polarización de los astrocitos hacia una subpoblación asociada a una respuesta inflamatoria, ya que este grupo experimental también presentó una disminución en la plasticidad sináptica estructural e incremento de los marcadores indirectos de estrés oxidativo.

Los astrocitos presentan diversos receptores acoplados a proteína G que pueden ser activados por neurotransmisores, neuromoduladores y neuropéptidos. Estos receptores regulan los niveles de AMPc intracelular. La presencia de

citoquinas proinflamatorias disminuye los niveles de AMPc y estimula la activación de NF- $\kappa$ B, mientras que el incremento de AMPc previene la acción de NF- $\kappa$ B y la subsecuente neuroinflamación (Zhou y col., 2019). Como fue mencionado anteriormente los astrocitos presentan receptores MC4, los cuales están asociados a proteína G que activan a la enzima adenilato ciclasa y el consecuente incremento de AMPc (Caruso y col., 2012). Se ha demostrado, en cultivo de astrocitos estimulados con mediadores inflamatorios, que la activación de MC4R reduce la producción de ON e iNOS, presenta acción antiapoptótica, incrementa la expresión de BDNF y la expresión de enzimas antioxidantes (Caruso y col., 2007b, 2012; Ramírez y col., 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es posible que el grupo DRG-LPS tratado con  $\alpha$ -MSH presente astrocitos que estén asociados a una respuesta antiinflamatoria, ya que el tratamiento con  $\alpha$ -MSH también demostró tener un efecto favorable en la expresión de la memoria de miedo contextual, en la plasticidad sináptica estructural y en el estrés oxidativo. Estos efectos no fueron acompañados de la disminución en el porcentaje de área ocupado por GFAP. Sin embargo, en algunas publicaciones se describe un aumento de GFAP tanto en astrocitos pro como antiinflamatorios (A1 o A2) (Potokar y col., 2020).

La importancia de conocer los efectos del consumo de una DRG sobre la consolidación de una memoria de miedo contextual y los mecanismos involucrados permitiría abordar posibles estrategias para lograr tratamientos que reviertan estos efectos.

Basándonos en antecedentes de nuestro laboratorio y de otras publicaciones, donde se demostró ampliamente el efecto neuroprotector, antiinflamatorio y antioxidante del péptido melanocortinérgico  $\alpha$ -MSH, y más aún con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, es que nos propusimos diseñar una posible estrategia terapéutica para la administración periférica del péptido. Se desarrollaron NP de quitosano con tween cargadas con un agonista sintético del receptor MC4, denominado [Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]- $\alpha$ -MSH (NDP- $\alpha$ -MSH).

$\alpha$ -MSH no presenta toxicidad para el organismo, sin embargo, su vida media es muy corta ya que es susceptible a la degradación enzimática. Por este motivo se han sintetizado agonistas capaces de aumentar la vida media del péptido sin

perder la afinidad por los receptores MC4, manteniendo de esta manera las características farmacodinámicas y cinéticas adecuadas para su distribución y acción. Se ha demostrado previamente en ensayos *in vitro* e *in vivo* que NDP- $\alpha$ -MSH conserva los efectos del péptido  $\alpha$ -MSH (Caruso y col., 2012; Ramírez y col., 2019).

Los experimentos conductuales que se utilizaron para determinar la eficacia de la terapia con nanopartículas fueron realizados en el modelo experimental de consumo de DRG por cinco días más el desafío inmune y también en un modelo experimental de consumo prolongado de DRG, de ocho semanas de ingesta.

En el modelo experimental de consumo corto de DRG asociado al estímulo con LPS, el tratamiento periférico con las NP cargadas con NDP- $\alpha$ -MSH revirtió el deterioro en la expresión de la memoria evaluada.

Evaluamos también un modelo de consumo prolongado de DRG (ocho semanas de ingesta), en el cual también observamos la interferencia en la expresión de la memoria. Estos resultados son consistentes con numerosos antecedentes que describen déficits cognitivos y otros cambios a nivel de SNC. Al igual que en el diseño experimental anterior, el empleo de la nanoterapia con NDP- $\alpha$ -MSH demostró ser efectiva para revertir el deterioro en la expresión de la memoria de miedo contextual.

Estos hallazgos sugieren que el uso de la nanoterapia es efectivo como estrategia para proteger al análogo de  $\alpha$ -MSH de la degradación enzimática y favorecer su llegada al hipocampo, y lo que es más importante, atenuar los daños a nivel cognitivo, asociados al consumo de DRG.

# CONCLUSIÓN

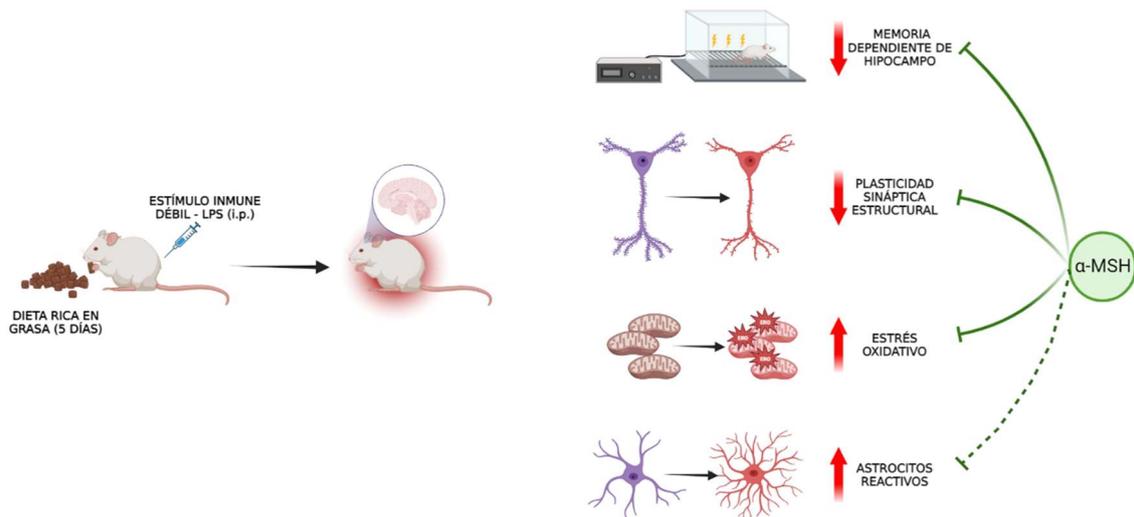


Los efectos neuroprotectores de  $\alpha$ -MSH han sido demostrados en modelos de neuroinflamación y de enfermedades neurodegenerativas. En este trabajo de tesis estudiamos su efecto en un modelo de neuroinflamación inducida por la ingesta de DRG, que no ha sido previamente abordado. Dado que el hipocampo es un área involucrada en los procesos de memoria y particularmente sensible a los procesos neuroinflamatorios, estudiamos los efectos de la dieta en la memoria contextual y los mecanismos involucrados. Se determinaron cambios en la plasticidad sináptica estructural, en el estado de estrés oxidativo y la reactividad de los astrocitos.

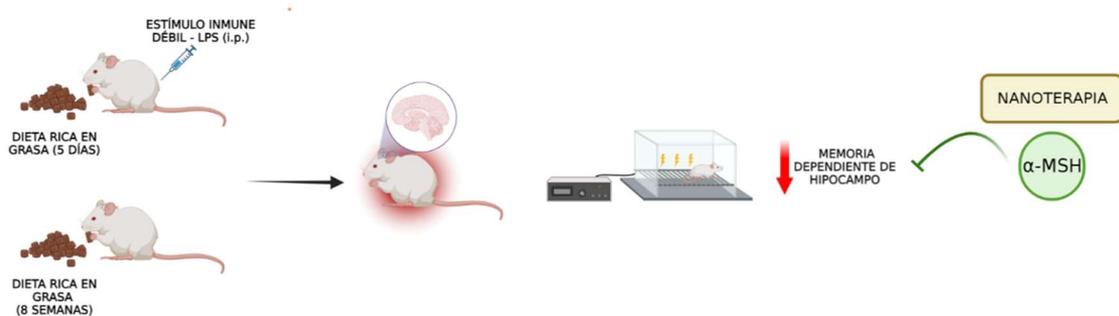
Los resultados demuestran que  $\alpha$ -MSH es capaz de revertir el déficit cognitivo actuando tanto a nivel neuronal como glial, induciendo cambios en la plasticidad sináptica, el estrés oxidativo y modulando la reactividad astrocitaria (**Fig. 27**).

El uso de la nanoterapia demostró ser eficiente para revertir el deterioro cognitivo en animales sometidos a DRG durante distintos períodos, y plantea el potencial desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (**Fig. 28**).

Los resultados obtenidos demuestran el importante efecto neuromodulador de  $\alpha$ -MSH en un proceso de neuroinflamación inducido por la ingesta de una dieta rica en grasas.



**Figura 27. Resumen gráfico del efecto neuroprotector de  $\alpha$ -MSH sobre el deterioro de una memoria dependiente de hipocampo y los cambios estructurales y moleculares inducidos por el consumo de DRG a corto plazo asociado a un estímulo inmune débil. Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).**



**Figura 28. Resumen gráfico del efecto eficaz de la nanoterapia sobre el deterioro de una memoria dependiente de hipocampo inducido por el consumo de DRG a corto plazo asociado a un estímulo inmune débil y a largo plazo. Creado en BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).**

# BIBLIOGRAFÍA



- 4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Dirección Nacional de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades Crónicas No Transmisibles. (2019).
- Abbott, K. N., Arnott, C. K., Westbrook, R. F., & Tran, D. M. D. (2019). The effect of high fat, high sugar, and combined high fat-high sugar diets on spatial learning and memory in rodents: A meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *107*, 399-421. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.08.010>
- Abdel-Malek Z. A. (2001). Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cellular and molecular life sciences*, *58*(3), 434-441. <https://doi.org/doi.org/10.1007/PL00000868>
- Abel, T., & Lattal, M. L. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(2), 180-187. [https://doi.org/doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00194-x](https://doi.org/doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00194-x)
- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groyzman, M., London, M., & Goshen, I. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*, *174*(1), 59-71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Alonso, M., Medina, J. H., & Pozzo-miller, L. (2004). *ERK1 / 2 Activation Is Necessary for BDNF to Increase Dendritic Spine Density in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons*. *11*(2), 172-178. <https://doi.org/10.1101/lm.67804.tant>
- Alves, S., Churlaud, G., Audrain, M., Michaelsen-Preusse, K., Fol, R., Souchet, B., Braudeau, J., Korte, M., Klatzmann, D., & Cartier, N. (2017). Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice. *Brain*, *140*(3), 826-842. <https://doi.org/10.1093/brain/aww330>
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and Contextual Fear Conditioning: Recent Controversies and Advances. *Hippocampus*, *11*(1), 8-17. [https://doi.org/doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7](https://doi.org/doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7)
- Attuquayefio, T., Stevenson, R. J., Oaten, M. J., & Francis, H. M. (2017). A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. *PLoS ONE*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172645>
- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Broadwell, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, *2*(4), 241-248. <https://doi.org/doi.org/10.1159/000097202>
- Barata Cavalcanti, O., Barquera, S., Baur, L., Busch, V., Buse, K., Dietz, B., French, A., Jackson Leach, R., van Opzeeland, B., Powis, J., Ralston, J., Roberts, K., Rudolf, M., Swinburn, B., Trayner, R., & Wilding, J. (2022). *World Obesity Atlas 2022*. [www.worldobesity.org](http://www.worldobesity.org)
- Barnes, P., Kirtley, A., & Thomas, K. L. (2012). Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus*, *22*(2), 149-171. <https://doi.org/10.1002/hipo.20879>
- Baym, C. L., Khan, N. A., Monti, J. M., Raine, L. B., Drollette, E. S., Moore, R. D., Scudder, M. R., Kramer, A. F., Hillman, C. H., & Cohen, N. J. (2014). Dietary lipids are differentially

- associated with hippocampal-dependent relational memory in prepubescent children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99(5), 1026-1033.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.113.079624>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.016>
- Bellfy, L., & Kwapis, J. L. (2020). Molecular mechanisms of reconsolidation-dependent memory updating. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1-18.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21186580>
- Bellinger, F. P., Madamba, S., & Siggins, G. R. (1993). Interleukin 1 $\beta$  inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Research*, 628(1-2), 227-234. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90959-q](https://doi.org/doi.org/10.1016/0006-8993(93)90959-q)
- Benarroch, E. E. (2019). Autonomic nervous system and neuroimmune interactions: New insights and clinical implications. *Neurology*, 92(8), 377-385.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006942>
- Benjannet, S., Rondeau, N., Dayt, R., Chrttien, M., & Seidahtt, N. G. (1991). PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(9), 3564-3568.  
<https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.88.9.3564>
- Benveniste, Y. N., Ping Tang, L., & Law, R. M. (1995). Differential regulation of astrocyte TNF- $\alpha$  expression by the cytokines TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-10. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13(3-4), 341-349. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)00061-7](https://doi.org/doi.org/10.1016/0736-5748(94)00061-7)
- Bertagna, X., Lenne, F., Comar, D., Massias, J.-F., Wajcmant, H., Baudint, V., Luton, J.-P., & Girardt, F. (1986). Human beta-melanocyte-stimulating hormone revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9719-9723.  
<https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.83.24.9719>
- Biswas, K., Alexander, K., & Francis, M. M. (2022). Reactive Oxygen Species: Angels and Demons in the Life of a Neuron. *NeuroSci*, 3(1), 130-145.  
<https://doi.org/10.3390/neurosci3010011>
- Blanchard, S. G., Harris, C. O., R Ittoop, O. R., Nichols, J. S., Parks, D. J., & Truesdale, A. T. (1995). Agouti Antagonism of Melanocortin Binding and Action in the B 16F10 Murine Melanoma Cell Line. *Biochemistry*, 34(33), 10406-10401.  
<https://doi.org/doi.org/10.1021/bi00033a012>
- Boghdadi, A. G., Teo, L., & Bourne, J. A. (2020). The Neuroprotective Role of Reactive Astrocytes after Central Nervous System Injury. *Journal of Neurotrauma*, 37(5), 681-691.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2019.6938>
- Bruce-Keller, A. J., Salbaum, J. M., Luo, M., Blanchard, E., Taylor, C. M., Welsh, D. A., & Berthoud, H. R. (2015). Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biological Psychiatry*, 77(7), 607-615.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.012>

- Buie, J. J., Watson, L. S., Smith, C. J., & Sims-Robinson, C. (2019). Obesity-related cognitive impairment: The role of endothelial dysfunction. *Neurobiology of Disease*, *132*, 104580. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104580>
- Calfa G., Chapleau CA., Campbell S., Inoue T., Morse SJ., Lubin FD L., & Pozzo-Miller. (2012). Hdac Activity is Required for Bdnf to Increase Quantal Neurotransmitter Release and Dendritic Spine Density in CA1 Pyramidal Neurons. *Hippocampus*, *22(7)*, 1493-1500. <https://doi.org/10.1002/hipo.20990>.Hdac
- Campillo, B. W., Galguera, D., Cerdan, S., López-Larrubia, P., & Lizarbe, B. (2022). Short-term high-fat diet alters the mouse brain magnetic resonance imaging parameters consistently with neuroinflammation on males and metabolic rearrangements on females. A pre-clinical study with an optimized selection of linear mixed-effects models. *Frontiers in Neuroscience*, *16*, 1025108. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1025108>
- Carniglia, L., Durand, D., Caruso, C., & Lasaga, M. (2013). Effect of NDP- $\alpha$ -MSH on PPAR- $\gamma$  and - $\beta$  Expression and Anti-Inflammatory Cytokine Release in Rat Astrocytes and Microglia. *PLoS ONE*, *8(2)*, e57313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057313>
- Carniglia, L., Ramírez, D., Durand, D., Saba, J., Caruso, C., & Lasaga, M. (2016). [Nle4, D-Phe7]- $\alpha$ -MSH inhibits toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-Induced microglial activation and promotes a M2-Like phenotype. *PLoS ONE*, *11(6)*, e0158564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158564>
- Carraro, R. S., Souza, G. F., Solon, C., Razolli, D. S., Chausse, B., Barbizan, R., Victorio, S. C., & Velloso, L. A. (2018). Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *460*, 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.029>
- Caruso, C., Carniglia, L., Durand, D., Gonzalez, P. V., Scimonelli, T. N., & Lasaga, M. (2012). Melanocortin 4 receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes through cyclic AMP - Protein kinase A pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *348(1)*, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.036>
- Caruso, C., Durand, D., Schiöth, H. B., Rey, R., Seilicovich, A., & Lasaga, M. (2007a). Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  in astrocytes. *Endocrinology*, *148(10)*, 4918-4926. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0366>
- Caruso, C., Durand, D., Schiöth, H. B., Rey, R., Seilicovich, A., & Lasaga, M. (2007b). Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  in astrocytes. *Endocrinology*, *148(10)*, 4918-4926. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0366>
- Caruso, C., Mohn, C., Karara, A. L., Rettori, V., Watanobe, H., Schiöthe, H. B., Seilicovich, A., & Lasaga, M. (2004). Alpha-melanocyte-stimulating hormone through melanocortin-4 receptor inhibits nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the hypothalamus of male rats. *Neuroendocrinology*, *79(5)*, 278-286. <https://doi.org/10.1159/000079321>
- Caruso, C., Sanchez, M., Durand, D., de la Cruz Perez, M., Gonzalez, P. V., Lasaga, M., & Scimonelli, T. N. (2010).  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone modulates

- lipopolysaccharide plus interferon- $\gamma$ -induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression but not tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor expression in cultured hypothalamic neurons. *Journal of Neuroimmunology*, 227(1-2), 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.06.013>
- Catania, A., Delgado, R., A. L., Cutuli, M., G. L., Carlin, A., Demitri, M. T., & Lipton, J. M. (1999). alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Central and peripheral actions. Annals of the New York Academy of Sciences.*, 885, 183-187. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08675.x>
- Catania, A., Gatti, S., Colombo, G., & Lipton, J. M. (2004). Targeting Melanocortin Receptors as a Novel Strategy to Control Inflammation. *Pharmacological Reviews*, 56(1), 1-29. <https://doi.org/10.1124/pr.56.1.1>
- Catania, A., Lonati, C., Sordi, A., Carlin, A., Leonardi, P., & Gatti, S. (2010). The melanocortin system in control of inflammation. *The Scientific World Journal*, 10, 1840-1853. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.173>
- Cavaliere, G., Trinchese, G., Penna, E., Cimmino, F., Pirozzi, C., Lama, A., Annunziata, C., Catapano, A., Mattace Raso, G., Meli, R., Monda, M., Messina, G., Zammit, C., Crispino, M., & Mollica, M. P. (2019). High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 509. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00509>
- Caviedes, A., Lafourcade, C., Soto, C., & Wyneken, U. (2017). BDNF/NF- $\kappa$ B Signaling in the Neurobiology of Depression. *Current Pharmaceutical Design*, 23(21), 3154-3163. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170111141915>
- Chai, B., Li, J. Y., Zhang, W., Ammori, J. B., & Mulholland, M. W. (2007). Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regulatory Peptides*, 139(1-3), 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.11.003>
- Chai, B., Li, J. Y., Zhang, W., Newman, E., Ammori, J., & Mulholland, M. W. (2006). Melanocortin-4 receptor-mediated inhibition of apoptosis in immortalized hypothalamic neurons via mitogen-activated protein kinase. *Peptides*, 27(11), 2846-2857. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.05.005>
- Chapleau, C. A., Larimore, J. L., Theibert, A., & Pozzo-Miller, L. (2009). Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: Fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(3), 185-196. <https://doi.org/10.1007/s11689-009-9027-6>
- Chapleau, C. A., & Pozzo-Miller, L. (2012). Divergent roles of p75NTR and Trk receptors in BDNF's effects on dendritic spine density and morphology. *Neural Plasticity*, 2012, 578057. <https://doi.org/10.1155/2012/578057>
- Chen, A. S., Marsh, D. J., Trumbauer, M. E., Frazier, E. G., Guan, X.-M., Yu, H., Rosenblum, C. I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J. M., Strack, A. M., Camacho, R. E., Mellin, T. N., Nunes, C. N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., Euan Macintyre, D., ... Van Der Ploeg, L. H. T. (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature genetics*, 26(1), 97-102. <https://doi.org/doi.org/10.1038/79254>

- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *92*, 161-193. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>
- Cowan, E. T., Schapiro, A. C., Dunsmoor, J. E., & Murty, V. P. (2021). Memory consolidation as an adaptive process. *Psychonomic bulletin & review*, *28*(6), 1796-1810. <https://doi.org/10.3758/s13423-021-01978-x/Published>
- Crispino, M., Trinchese, G., Penna, E., Cimmino, F., Catapano, A., Villano, I., Perrone-Capano, C., & Mollica, M. P. (2020). Interplay between peripheral and central inflammation in obesity-promoted disorders: The impact on synaptic mitochondrial functions. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1-22. <https://doi.org/10.3390/ijms21175964>
- Cui, M., Huang, Y., Tian, C., Zhao, Y., & Zheng, J. (2011). FOXO3a inhibits TNF- $\alpha$ - and IL-1 $\beta$ -induced astrocyte proliferation: Implication for reactive astrogliosis. *GLIA*, *59*(4), 641-654. <https://doi.org/10.1002/glia.21134>
- Daverey, A., & Agrawal, S. K. (2016). Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Neuroscience*, *333*, 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.012>
- Davidson, T. L., Monnot, A., Neal, A. U., Martin, A. A., Horton, J. J., & Zheng, W. (2012). The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiology and Behavior*, *107*(1), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.015>
- Davis, J. A., Paul, J. R., Yates, S. D., Cutts, E. J., McMahon, L. L., Pollock, J. S., Pollock, D. M., Bailey, S. M., & Gamble, K. L. (2021). Time-restricted feeding rescues high-fat-diet-induced hippocampal impairment. *iScience*, *24*(6). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102532>
- de Paula, G. C., Brunetta, H. S., Engel, D. F., Gaspar, J. M., Velloso, L. A., Engblom, D., de Oliveira, J., & de Bem, A. F. (2021). Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood–Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 734158. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.734158>
- Delgado, R., Carlin, A., Airaghi, L., Demitri, M. T., Meda, L., Galimberti, D., Baron, P., Lipton, J. M., & Catania, A. (1998). Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *Journal of Leukocyte Biology*, *63*(6), 740-745. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.6.740>
- Di Filippo, M., Chiasserini, D., Gardoni, F., Viviani, B., Tozzi, A., Giampà, C., Costa, C., Tantucci, M., Zianni, E., Boraso, M., Siliquini, S., de Iure, A., Ghiglieri, V., Colcelli, E., Baker, D., Sarchielli, P., Fusco, F. R., Di Luca, M., & Calabresi, P. (2013). Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Disease*, *52*, 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.009>

- Dietrich, M. O., Liu, Z. W., & Horvath, T. L. (2013). Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell*, *155*(1), 188. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.004>
- Dinareello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, *27*, 519-550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Dingess, P. M., Darling, R. A., Kurt Dolence, E., Culver, B. W., & Brown, T. E. (2017). Exposure to a diet high in fat attenuates dendritic spine density in the medial prefrontal cortex. *Brain Structure and Function*, *222*(2), 1077-1085. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1208-y>
- Dinulescu, D. M., & Cone, R. D. (2000). Agouti and Agouti-related protein: Analogies and contrasts. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(10), 6695-6698. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.6695>
- Dudai Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology*, *12*(2), 211-216. [https://doi.org/doi.org/10.1016/s0959-4388\(02\)00305-7](https://doi.org/doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00305-7)
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature reviews. Neuroscience*, *1*(1), 41-50. <https://doi.org/doi.org/10.1038/35036213>
- Eichenbaum H. (2003). How does the hippocampus contribute to memory? *Trends in Cognitive Sciences*, *7*(10), 427-429. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2003.08.008>
- Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., & Bunsey, M. (1996). *Functional organization of the hippocampal memory system*. *93*(4), 13500-13507. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.93.24.13500>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, *24*(3), 312-325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Eves, P. C., & Haycock, J. W. (2010). Melanocortin signalling mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology*, *681*, 19-28. [https://doi.org/doi.org/10.1007/978-1-4419-6354-3\\_2](https://doi.org/doi.org/10.1007/978-1-4419-6354-3_2)
- Eves, P., Haycock, J., Layton, C., Wagner, M., Kemp, H., Szabo, M., Morandini, R., Ghanem, G., García-Borrón, J. C., Jiménez-Cervantes, C., & Mac Neil, S. (2003). Anti-inflammatory and anti-invasive effects of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in human melanoma cells. *British Journal of Cancer*, *89*(10), 2004-2015. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601349>
- Fan, Y. Y., & Huo, J. (2021). A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochemistry International*, *148*, 105080. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>
- Fanselow M. S. (1998). Pavlovian conditioning, negative feedback, and blocking: mechanisms that regulate association formation. *Neuron*, *20*(4), 625-627. [https://doi.org/doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81002-8](https://doi.org/doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81002-8)

- Fanselow, M. S., & Poulos, A. M. (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annual Review of Psychology, 56*, 207-234.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070213>
- Fei, X., Dou, Y. nan, Wang, L., Wu, X., Huan, Y., Wu, S., He, X., Lv, W., Wei, J., & Fei, Z. (2022). Homer1 promotes the conversion of A1 astrocytes to A2 astrocytes and improves the recovery of transgenic mice after intracerebral hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation, 19*(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02428-8>
- Flores-Dorantes, M. T., Díaz-López, Y. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Environment and Gene Association With Obesity and Their Impact on Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases. *Frontiers in Neuroscience, 14*(863).  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00863>
- Forslin Aronsson, Å., Spulber, S., Popescu, L. M., Winblad, B., Post, C., Oprica, M., & Schultzberg, M. (2006).  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia. *Neuropeptides, 40*(1), 65-75.  
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2005.10.006>
- Francis, H. M., & Stevenson, R. J. (2011). Higher Reported Saturated Fat and Refined Sugar Intake Is Associated With Reduced Hippocampal-Dependent Memory and Sensitivity to Interoceptive Signals. *Behavioral Neuroscience, 125*(6), 943-955.  
<https://doi.org/10.1037/a0025998>
- Gabay, C., Lamacchia, C., & Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology, 6*(4), 232-241.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.4>
- Gantz, I., & Fong, T. M. (2003). The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab, 284*, E468-E474. <https://doi.org/10.1152/ajpendo>
- García-García, I., Michaud, A., Jurado, M. Á., Dagher, A., & Morys, F. (2022). Mechanisms linking obesity and its metabolic comorbidities with cerebral grey and white matter changes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 23*(4), 833-843.  
<https://doi.org/10.1007/s11154-021-09706-5>
- Getting, S. J., & Perretti, M. (2000). MC3-R as a novel target for antiinflammatory therapy. *Drug news & perspectives, 13*(1), 19-27.
- Giachero, M., Calfa, G. D., & Molina, V. A. (2015). Hippocampal dendritic spines remodeling and fear memory are modulated by GABAergic signaling within the basolateral amygdala complex. *Hippocampus, 25*(5), 545-555. <https://doi.org/10.1002/hipo.22409>
- Giovannoni, F., & Quintana, F. J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. En *Trends in Immunology* (Vol. 41, Número 9, pp. 805-819). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>
- Giuliani, D., Galantucci, M., Neri, L., Canalini, F., Calevro, A., Bitto, A., Ottani, A., Vandini, E., Sena, P., Sandrini, M., Squadrito, F., Zaffe, D., & Guarini, S. (2014a). Melanocortins protect against brain damage and counteract cognitive decline in a transgenic mouse model of moderate Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology, 740*, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.063>

- Giuliani, D., Galantucci, M., Neri, L., Canalini, F., Calevro, A., Bitto, A., Ottani, A., Vandini, E., Sena, P., Sandrini, M., Squadrito, F., Zaffe, D., & Guarini, S. (2014b). Melanocortins protect against brain damage and counteract cognitive decline in a transgenic mouse model of moderate Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.063>
- Giuliani, D., Mioni, C., Altavilla, D., Leone, S., Bazzani, C., Minutoli, L., Bitto, A., Cainazzo, M. M., Marini, H., Zaffe, D., Botticelli, A. R., Pizzala, R., Savio, M., Necchi, D., Schiöth, H. B., Bertolini, A., Squadrito, F., & Guarini, S. (2006). Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinology*, *147*(3), 1126-1135. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0692>
- Giuliani, D., Neri, L., Canalini, F., Calevro, A., Ottani, A., Vandini, E., Sena, P., Zaffe, D., & Guarini, S. (2015). NDP- $\alpha$ -MSH induces intense neurogenesis and cognitive recovery in Alzheimer transgenic mice through activation of melanocortin MC4 receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *67*, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.05.004>
- Giuliani, D., Ottani, A., Minutoli, L., Stefano, V. Di, Galantucci, M., Bitto, A., Zaffe, D., Altavilla, D., Botticelli, A. R., Squadrito, F., & Guarini, S. (2009). Functional recovery after delayed treatment of ischemic stroke with melanocortins is associated with overexpression of the activity-dependent gene Zif268. *Brain, Behavior, and Immunity*, *23*(6), 844-850. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.03.009>
- Golia, M. T., Poggini, S., Alboni, S., Garofalo, S., Ciano Albanese, N., Viglione, A., Ajmone-Cat, M. A., St-Pierre, A., Brunello, N., Limatola, C., Branchi, I., & Maggi, L. (2019). Interplay between inflammation and neural plasticity: Both immune activation and suppression impair LTP and BDNF expression. *Brain, Behavior, and Immunity*, *81*, 484-494. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.003>
- Gonzalez, P., Machado, I., Vilcaes, A., Caruso, C., Roth, G. A., Schiöth, H., Lasaga, M., & Scimonelli, T. (2013). Molecular mechanisms involved in interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ )-induced memory impairment. Modulation by alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH). *Brain, Behavior, and Immunity*, *34*, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.08.007>
- Gonzalez, P. V., Schiöth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, T. N. (2009). Memory impairment induced by IL-1 $\beta$  is reversed by  $\alpha$ -MSH through central melanocortin-4 receptors. *Brain, Behavior, and Immunity*, *23*(6), 817-822. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.03.001>
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalzstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., & Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(8-10), 1106-1115. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.09.004>
- Goto, A. (2022). Synaptic plasticity during systems memory consolidation. *Neuroscience Research*, *183*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.05.008>
- Hajer, G. R., Van Haefen, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, *29*(24), 2959-2971. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>

- Hao, S., Dey, A., Yu, X., & Stranahan, A. M. (2016). Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain, Behavior, and Immunity*, *51*, 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.023>
- Hauptmann, J., Johann, L., Marini, F., Kitic, M., Colombo, E., Mufazalov, I. A., Krueger, M., Karram, K., Moos, S., Wanke, F., Kurschus, F. C., Klein, M., Cardoso, S., Strauß, J., Bolisetty, S., Lühder, F., Schwaninger, M., Binder, H., Bechman, I., ... Waisman, A. (2020). Interleukin-1 promotes autoimmune neuroinflammation by suppressing endothelial heme oxygenase-1 at the blood–brain barrier. *Acta Neuropathologica*, *140*(4), 549-567. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02187-x>
- Heras, V. Las, Clooney, A. G., Ryan, F. J., Cabrera-Rubio, R., Casey, P. G., Hueston, C. M., Pinheiro, J., Rudkin, J. K., Melgar, S., Cotter, P. D., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2019). Short-term consumption of a high-fat diet increases host susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiome*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0621-x>
- Hernández, R. D., Demitri, M. T., Carlin, A., Meazza, C., Villa, P., Ghezzi, P., Lipton, J. M., & Catania, A. (1999). Inhibition of systemic inflammation by central action of the neuropeptide  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone. *NeuroImmunoModulation*, *6*(3), 187-192. <https://doi.org/10.1159/000026381>
- Herraiz, C., Journé, F., Abdel-Malek, Z., Ghanem, G., Jiménez-Cervantes, C., & García-Borrón, J. C. (2011). Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Molecular Endocrinology*, *25*(1), 138-156. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0217>
- Herrera, G., Calfa, G., Schiöth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, T. (2019). Memory consolidation impairment induced by Interleukin-1 $\beta$  is associated with changes in hippocampal structural plasticity. *Behavioural Brain Research*, *370*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111969>
- Hikosaka, M., Kawano, T., Wada, Y., Maeda, T., Sakurai, T., & Ohtsuki, G. (2022). Immune-Triggered Forms of Plasticity Across Brain Regions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*, 925493. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.925493>
- Holder, J. R., & Haskell-Luevano, C. (2004). Melanocortin Ligands: 30 Years of Structure-Activity Relationship (SAR) Studies. *Medicinal Research Reviews*, *24*(3), 325-356. <https://doi.org/10.1002/med.10064>
- Huang, T. T., Leu, D., & Zou, Y. (2015). Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *576*, 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.014>
- Hyvärinen, T., Hagman, S., Ristola, M., Sukki, L., Veijula, K., Kreutzer, J., Kallio, P., & Narkilahti, S. (2019). Co-stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induces an inflammatory reactive astrocyte phenotype with neurosupportive characteristics in a human pluripotent stem cell model system. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53414-9>
- Ilyin, S. E., & Plata-Salamán, C. R. (1996). *In Vivo Regulation of the IL-1beta System (Ligand, Receptors I and II, Receptor Accessory Protein, and Receptor Antagonist) and TNF-alpha mRNAs in Specific Brain Regions*. *227*(3), 861-867. <https://doi.org/doi.org/10.1006/bbrc.1996.1597>

- Jaganjac, M., Milkovic, L., Zarkovic, N., & Zarkovic, K. (2022). Oxidative stress and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, *181*, 154-165. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.004>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, *517*(7534), 284-292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jiang, S., Baba, K., Okuno, T., Kinoshita, M., Choong, C. J., Hayakawa, H., Sakiyama, H., Ikenaka, K., Nagano, S., Sasaki, T., Shimamura, M., Nagai, Y., Hagihara, K., & Mochizuki, H. (2021). Go-sha-jinki-Gan Alleviates Inflammation in Neurological Disorders via p38-TNF Signaling in the Central Nervous System. *Neurotherapeutics*, *18*(1), 460-473. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00948-w>
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & Ledoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, *147*(3), 509-524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>
- Johnson, J. D., O'Connor, K. A., Deak, T., Stark, M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2002). Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain, Behavior, and Immunity*, *16*(4), 461-476. <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0638>
- Jones, M. E., Lebonville, C. L., Paniccia, J. E., Balentine, M. E., Reissner, K. J., & Lysle, D. T. (2018). Hippocampal interleukin-1 mediates stress-enhanced fear learning: A potential role for astrocyte-derived interleukin-1 $\beta$ . *Brain, Behavior, and Immunity*, *67*, 355-363. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.016>
- Kandel, E. R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *92*(6762), 1030-1038. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology and Behavior*, *103*(1), 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.12.003>
- Khazen, T., Hatoum, O. A., Ferreira, G., & Maroun, M. (2019). Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids. *Scientific Reports*, *9*(1), 12270. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48800-2>
- Koh, I. Y. Y., Lindquist, W. B., Zito, K., Nimchinsky, E. A., & Svoboda, K. (2002). An Image Analysis Algorithm for Dendritic Spines. *Neural computation*, *14*(6), 1283-1310. <https://doi.org/doi.org/10.1162/089976602753712945>
- Kolotkin, R. L., Meter, K., & Williams, G. R. (2001). Quality of life and obesity. *Obesity Reviews*, *2*(4), 219-229. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789X.2001.00040.x>
- Konda, Y., Gantz, I., DelValle, J., Shimoto, Y., Miwa, H., & Yamada, T. (1994). Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(18), 13162-13166. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36813-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36813-8)
- Lama, A., Pirozzi, C., Annunziata, C., Morgese, M. G., Senzacqua, M., Severi, I., Calignano, A., Trabace, L., Giordano, A., Meli, R., & Mattace Raso, G. (2021). Palmitoylethanolamide counteracts brain fog improving depressive-like behaviour in obese mice: Possible role of

- synaptic plasticity and neurogenesis. *British Journal of Pharmacology*, 178(4), 845-859.  
<https://doi.org/10.1111/bph.15071>
- Lancaster, G. I., Langley, K. G., Berglund, N. A., Kammoun, H. L., Reibe, S., Estevez, E., Weir, J., Mellett, N. A., Pernes, G., Conway, J. R. W., Lee, M. K. S., Timpson, P., Murphy, A. J., Masters, S. L., Gerondakis, S., Bartonicek, N., Kaczorowski, D. C., Dinger, M. E., Meikle, P. J., ... Febbraio, M. A. (2018). Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metabolism*, 27(5), 1096-1110.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.014>
- Lasker, S., Rahman, M. M., Parvez, F., Zamila, M., Miah, P., Nahar, K., Kabir, F., Sharmin, S. B., Subhan, N., Ahsan, G. U., & Alam, M. A. (2019). High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. *Scientific Reports*, 9(1), 20026. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56538-0>
- Lau, J. K. Y., Tian, M., Shen, Y., Lau, S. F., Fu, W. Y., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2021). Melanocortin receptor activation alleviates amyloid pathology and glial reactivity in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Scientific Reports*, 11(1), 4359.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83932-4>
- Ledoux, J. (1996). Emotional networks and motor control: a fearful view. *Progress in Brain Research*, 107, 437-446. [https://doi.org/doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61880-4](https://doi.org/doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61880-4)
- LeDoux J. (2007). The amygdala. *Current biology*, 17(20), R868-R874.  
<https://doi.org/doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005>
- Ledoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci*, 23, 155-184.  
<https://doi.org/doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Lee, H. G., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5), 339-358.  
<https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>
- Lee, J. L. C., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*, 304(5672), 839-843.  
<https://doi.org/doi.org/10.1126/science.1095760>
- Lee, K. H., Cha, M., & Lee, B. H. (2021). Crosstalk between neuron and glial cells in oxidative injury and neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13315.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222413315>
- Lee, S. H., & Suk, K. (2017). Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation. *Biochemical Pharmacology*, 146, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.137>
- Leigh Gibson, E., Barr, S., & Jeanes, Y. M. (2013). Habitual fat intake predicts memory function in younger women. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7(DEC), 1-12.  
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00838>
- Leigh, S. J., & Morris, M. J. (2020). Diet, inflammation and the gut microbiome: Mechanisms for obesity-associated cognitive impairment. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165767. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165767>

- Lindberg, C., Hjorth, E., Post, C., Winblad, B., & Schultzberg, M. (2005). Cytokine production by a human microglial cell line: effects of beta-amyloid and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Neurotoxicity research*, 8(3-4), 267-276. <https://doi.org/10.1007/BF03033980>
- Liu, J. F., Tian, J., & Li, J. X. (2019). Modulating reconsolidation and extinction to regulate drug reward memory. *European Journal of Neuroscience*, 50(3), 2503-2512. <https://doi.org/10.1111/ejn.14072>
- Liu, X., & Quan, N. (2018). Microglia and CNS interleukin-1: Beyond immunological concepts. *Frontiers in Neurology*, 9, 8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00008>
- Lomo, T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), 617-620. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1226>
- Luger, T. A., & Brzoska, T. (2007).  $\alpha$ -MSH related peptides: A new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(SUPPL. 3). <https://doi.org/10.1136/ard.2007.079780>
- Lyon, K. A., & Allen, N. J. (2022). From Synapses to Circuits, Astrocytes Regulate Behavior. *Frontiers in Neural Circuits*, 15, 786293. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.786293>
- Machado, I., González, P., Schiöth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, T. N. (2010).  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) reverses impairment of memory reconsolidation induced by interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) hippocampal infusions. *Peptides*, 31(11), 2141-2144. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.07.018>
- Machado, I., Schiöth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, T. (2018). IL-1 $\beta$  reduces GluA1 phosphorylation and its surface expression during memory reconsolidation and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone can modulate these effects. *Neuropharmacology*, 128, 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.041>
- Magri-Tomaz, L., Melbouci, L., Mercier, J., Ou, Y., Auclair, N., Lira, F. S., Lavoie, J. M., & St-Pierre, D. H. (2018). Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. *Cell Biochemistry and Function*, 36(7), 387-393. <https://doi.org/10.1002/cbf.3358>
- Maren, S. (2001). NEUROBIOLOGY OF PAVLOVIAN FEAR CONDITIONING. *Annual review of neuroscience*, 24, 897-931. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: Implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 417-428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492>
- Martínez Leo, E. E., Peñafiel, A. M., Hernández Escalante, V. M., & Cabrera Araujo, Z. M. (2021). Ultra-processed diet, systemic oxidative stress, and breach of immunologic tolerance. *Nutrition*, 91-92, 111419. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111419>
- Martins, I. C. A., Contieri, L. S., Amaral, C. L., Costa, S. O., Souza, A. C. P., Ignacio-Souza, L. M., Milanski, M., Torsoni, A. S., & Torsoni, M. A. (2021). Omega-3 Supplementation Prevents Short-Term High-Fat Diet Effects on the  $\alpha$  7 Nicotinic Cholinergic Receptor Expression and

- Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, 2021, 5526940.  
<https://doi.org/10.1155/2021/5526940>
- Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal*, 14(10), 2013-2054.  
<https://doi.org/doi.org/10.1089/ars.2010.3208>
- Matsuo, N., Reijmers, L., & Mayford, M. (2008). Spine-type-specific recruitment of newly synthesized AMPA receptors with learning. *Science*, 319(5866), 1104-1107.  
<https://doi.org/10.1126/science.1149967>
- Matsuzawa-Nagata, N., Takamura, T., Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Yokoyama, M., Honda, M., Miyamoto, K. ichi, & Kaneko, S. (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57(8), 1071-1077.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.010>
- Mattson, M. P., & Liu, D. (2002). Energetics and Oxidative Stress in Synaptic Plasticity and Neurodegenerative Disorders. *Neuromolecular Medicine*, 2(2), 215-231.  
<https://doi.org/doi.org/10.1385/NMM:2:2:215>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory-a Century of Consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.  
<https://doi.org/doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- McKenzie, S., & Eichenbaum, H. (2011). Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? *Neuron*, 71(2), 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.037>
- Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 781-795. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421-443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
- Morgado-Bernal, I. (2011). Learning and memory consolidation: Linking molecular and behavioral data. *Neuroscience*, 176, 12-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.056>
- Mountjoy, K. G. (2015). Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurons, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(6), 406-418.  
<https://doi.org/10.1111/jne.12285>
- Natarajan, K., Manna, S. K., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (1998). Protein Tyrosine Kinase Inhibitors Block Tumor Necrosis Factor-Induced Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B, Degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , Nuclear Translocation of p65, and Subsequent Gene Expression. *Archives of biochemistry and biophysics*, 352(1), 59-70.  
<https://doi.org/doi.org/10.1006/abbi.1998.0576>
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), 65-75. <https://doi.org/doi.org/10.1038/nrn2303>

- Newman, E. A., Chai, B. X., Zhang, W., Li, J. Y., Ammori, J. B., & Mulholland, M. W. (2006). Activation of the Melanocortin-4 Receptor Mobilizes Intracellular Free Calcium in Immortalized Hypothalamic Neurons. *Journal of Surgical Research*, *132*(2), 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.02.003>
- O'Brien, P. D., Hinder, L. M., Callaghan, B. C., & Feldman, E. L. (2017). Neurological consequences of obesity. *The Lancet Neurology*, *16*(6), 465-477. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30084-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30084-4)
- Ogundele, O. M., Omoaghe, A. O., Ajonijebu, D. C., Ojo, A. A., Fabiyi, T. D., Olajide, O. J., Falode, D. T., & Adeniyi, P. A. (2014). Glia activation and its role in oxidative stress. *Metabolic Brain Disease*, *29*(2), 483-493. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9446-7>
- Olcum, M., Tastan, B., Kiser, C., Genc, S., & Genc, K. (2020). Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *119*, 247-308. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.08.007>
- Olsthoorn, L., Vreeken, D., & Kiliaan, A. J. (2021). Gut Microbiome, Inflammation, and Cerebrovascular Function: Link Between Obesity and Cognition. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 761456. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.761456>
- Parimisetty, A., Dorsemans, A. C., Awada, R., Ravanan, P., Diotel, N., & Lefebvre d'Hellencourt, C. (2016). Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0530-x>
- Park, H., Kim, M., S. I. J., Park, J., B. S. Y., Yi, C., Kim, M. A., Lew, J. H., Suh, J. W., & Maeng, S. (2018). Woohwangcheongsimwon Prevents High-Fat Diet-Induced Memory Deficits and Induces SIRT1 in Mice. *Journal of medicinal food*, *21*(2), 167-173. <https://doi.org/doi.org/10.1089/jmf.2017.3925>
- Parnass, Z., Tashiro, A., & Yuste, R. (2000). Analysis of Spine Morphological Plasticity in Developing Hippocampal Pyramidal Neurons. *Hippocampus*, *10*(5), 561-568. [https://doi.org/doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:5<561::AID-HIPO6>3.0.CO;2-X](https://doi.org/doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:5<561::AID-HIPO6>3.0.CO;2-X)
- Parnet, P., Kelley, K. W., Bluthé, R.-M., & Dantzer, R. (2002). Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *Journal of neuroimmunology*, *125*(1-2), 5-14. [https://doi.org/doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00022-x](https://doi.org/doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00022-x)
- Paulo, S. L., Miranda-Lourenço, C., Belo, R. F., Rodrigues, R. S., Fonseca-Gomes, J., Tanqueiro, S. R., Geraldés, V., Rocha, I., Sebastião, A. M., Xapelli, S., & Diógenes, M. J. (2021). High caloric diet induces memory impairment and disrupts synaptic plasticity in aged rats. *Current Issues in Molecular Biology*, *43*(3), 2305-2319. <https://doi.org/10.3390/cimb43030162>
- Paxinos, W. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates, sixth ed. *Academic Press*. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(80\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(80)90021-7)
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. En *Neuroscience Letters* (Vol. 565, pp. 30-38). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>

- Phillips, M., & Pozzo-Miller, L. (2014). Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience Letters*, *601*, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011>
- Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgačevski, J. (2020). The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. *Cells*, *9*(7), 1604. <https://doi.org/10.3390/cells9071604>
- Preininger, M. K., & Kaufer, D. (2022). Blood–Brain Barrier Dysfunction and Astrocyte Senescence as Reciprocal Drivers of Neuropathology in Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 6217. <https://doi.org/10.3390/ijms23116217>
- Prem, P. N., & Kurian, G. A. (2021). High-Fat Diet Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Induced by Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rat. *Frontiers in Physiology*, *12*, 715693. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.715693>
- Pritchard, L. E., Turnbull, A. V., & White, A. (2002). Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *Journal of Endocrinology*, *172*, 411-421. <https://doi.org/doi.org/10.1677/joe.0.1720411>
- Quillfeldt, J. A. (2015). Behavioral methods to study learning and memory in rats. En *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research* (pp. 271-311). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-11578-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11578-8_17)
- Quintanilla, R. A., Pérez, M. J., Aranguiz, A., Tapia-Monsalves, C., & Mendez, G. (2020). Activation of the Melanocortin-4 Receptor Prevents Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction in Cultured Hippocampal Neurons Exposed to Ethanol. *Neurotoxicity Research*, *38*(2), 421-433. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00204-1>
- Ramírez, D., Saba, J., Turati, J., Carniglia, L., Imsen, M., Mohn, C., Scimonelli, T., Durand, D., Caruso, C., & Lasaga, M. (2019). NDP-MSH reduces oxidative damage induced by palmitic acid in primary astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(2). <https://doi.org/10.1111/jne.12673>
- Ramírez, S., Haddad-Tóvolli, R., Radošević, M., Toledo, M., Pané, A., Alcolea, D., Ribas, V., Milà-Guasch, M., Pozo, M., Obri, A., Eyre, E., Gómez-Valadés, A. G., Chivite, I., Van Eeckhout, T., Zalachoras, I., Altirriba, J., Bauder, C., Imbernón, M., Garrabou, G., ... Claret, M. (2022). Hypothalamic pregnenolone mediates recognition memory in the context of metabolic disorders. *Cell Metabolism*, *34*(2), 269-284.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.023>
- Ratsika, A., Cruz Pereira, J. S., Lynch, C. M. K., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2023). Microbiota-immune-brain interactions: A lifespan perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, *78*, 102652. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102652>
- Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L., & Sánchez-Infantes, D. (2021). White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochemical Pharmacology*, *192*, 114723. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114723>
- Saba, J., Turati, J., Ramírez, D., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., & Caruso, C. (2018). Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, *146*(6), 686-702. <https://doi.org/10.1111/jnc.14476>

- Sabogal-Guáqueta, A. M., Marmolejo-Garza, A., de Pádua, V. P., Eggen, B., Boddeke, E., & Dolga, A. M. (2020). Microglia alterations in neurodegenerative diseases and their modeling with human induced pluripotent stem cell and other platforms. *Progress in Neurobiology*, *190*, 101805. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101805>
- Saiyasit, N., Chunchai, T., Apaijai, N., Pratchayasakul, W., Sripetchwandee, J., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2020). Chronic high-fat diet consumption induces an alteration in plasma/brain neurotensin signaling, metabolic disturbance, systemic inflammation/oxidative stress, brain apoptosis, and dendritic spine loss. *Neuropeptides*, *82*, 102047. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102047>
- Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *360*(1), 201-205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- Sanmarco, L. M., Polonio, C. M., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Functional immune cell–astrocyte interactions. *Journal of Experimental Medicine*, *218*(9), e20202715. <https://doi.org/10.1084/jem.20202715>
- Sarkar, S., Légrádi, G., & Lechan, R. M. (2002). Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain research*, *945*(1), 50-59. [https://doi.org/doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02619-7](https://doi.org/doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02619-7)
- Schiöth HB, Caruso V, Lagerström MC, Olszewski PK, F. R. (2014). Synaptic changes induced by melanocortin signalling. *Nat Rev Neurosci*, *15*(2), 98-110. <https://doi.org/10.1038/nrn3657>
- Sharma, S. (2021). High fat diet and its effects on cognitive health: alterations of neuronal and vascular components of brain. *Physiology and Behavior*, *240*, 113528. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113528>
- Shen, Y., Fu, W. Y., Cheng, E. Y. L., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2013). Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, *33*(2), 464-472. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3282-12.2013>
- Shen, Y., Tian, M., Zheng, Y., Gong, F., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2016). Stimulation of the Hippocampal POMC/MC4R Circuit Alleviates Synaptic Plasticity Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Reports*, *17*(7), 1819-1831. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.043>
- Sobesky, J. L., Barrientos, R. M., De May, H. S., Thompson, B. M., Weber, M. D., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2014). High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 $\beta$ , an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain, Behavior, and Immunity*, *42*, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.017>
- Sobesky, J. L., D'Angelo, H. M., Weber, M. D., Anderson, N. D., Frank, M. G., Watkins, L. R., Maier, S. F., & Barrientos, R. M. (2016). Glucocorticoids mediate short-term high-fat diet induction of neuroinflammatory priming, the NLRP3 inflammasome, and the danger signal HMGB1. *eNeuro*, *3*(4), ENEURO.0113-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0113-16.2016>

- Song, Z., Shen, F., Zhang, Z., Wu, S., & Zhu, G. (2020). Calpain inhibition ameliorates depression-like behaviors by reducing inflammation and promoting synaptic protein expression in the hippocampus. *Neuropharmacology*, *174*, 108175. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108175>
- Soung, A., & S. Klein, R. (2020). Astrocytes: Initiators of and Responders to Inflammation. En *Glia in Health and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89760>
- Souza, A. C. P., Souza, C. M., Amaral, C. L., Lemes, S. F., Santucci, L. F., Milanski, M., Torsoni, A. S., & Torsoni, M. A. (2019). Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit ( $\alpha 7nAChR$ ) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis. *Frontiers in Immunology*, *10*, 565. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00565>
- Spaccapelo, L., Bitto, A., Galantucci, M., Ottani, A., Irrera, N., Minutoli, L., Altavilla, D., Novellino, E., Grieco, P., Zaffe, D., Squadrito, F., Giuliani, D., & Guarini, S. (2011). Melanocortin MC4 receptor agonists counteract late inflammatory and apoptotic responses and improve neuronal functionality after cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology*, *670*(2-3), 479-486. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.015>
- Spencer, S. J., D'Angelo, H., Soch, A., Watkins, L. R., Maier, S. F., & Barrientos, R. M. (2017). High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal- and amygdalar-dependent memory. *Neurobiology of Aging*, *58*, 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.014>
- Sutton, G. M., Duos, B., Patterson, L. M., & Berthoud, H. R. (2005). Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through ERK signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology*, *146*(9), 3739-3747. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0562>
- Swarnkar, S., Tyagi, E., Agrawal, R., Singh, M. P., & Nath, C. (2009). A comparative study on oxidative stress induced by LPS and rotenone in homogenates of rat brain regions. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *27*(2), 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.10.003>
- Takehara-Nishiuchi, K. (2021). Neurobiology of systems memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, *54*(8), 6850-6863. <https://doi.org/10.1111/ejn.14694>
- Valcarcel-Ares, M. N., Tucsek, Z., Kiss, T., Giles, C. B., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., Balasubramanian, P., Gautam, T., Galvan, V., Ballabh, P., Richardson, A., Freeman, W. M., Wren, J. D., Deak, F., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2019). Obesity in aging exacerbates neuroinflammation, dysregulating synaptic function-related genes and altering eicosanoid synthesis in the mouse hippocampus: Potential role in impaired synaptic plasticity and cognitive decline. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *74*(3), 290-298. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly127>
- Van Dyken, P., & Lacoste, B. (2018). Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 930. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00930>

- Van Giau, V., Wu, S. Y., Jamerlan, A., An, S. S. A., Kim, S. Y., & Hulme, J. (2018). Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in alzheimer's disease. *Nutrients*, *10*(11), 1765. <https://doi.org/10.3390/nu10111765>
- Váradí, J., Harazin, A., Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Gogolák, P., Vámosi, G., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Róka, E., Haines, D., Deli, M. A., & Vecsernyés, M. (2017). Alpha-melanocyte stimulating hormone protects against cytokine-induced barrier damage in caco-2 intestinal epithelial monolayers. *PLoS ONE*, *12*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170537>
- Vongs, A., Lynn, N. M., & Rosenblum, C. I. (2004). Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regulatory Peptides*, *120*(1-3), 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.02.018>
- Waise, T. M. Z., Toshinai, K., Naznin, F., NamKoong, C., Md Moin, A. S., Sakoda, H., & Nakazato, M. (2015). One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *464*(4), 1157-1162. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.097>
- Wallenstein, G. V. , Eichenbaum, H. , & Hasselmo, M. E. (1998). The hippocampus as an associator of discontiguous events. *Trends in neurosciences*, *21*(8), 317-323. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01220-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01220-4)
- Wang, P., Mariman, E., Renes, J., & Keijer, J. (2008). The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *Journal of Cellular Physiology*, *216*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1002/jcp.21386>
- Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *2*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- Wang, Z., Ge, Q., Wu, Y., Zhang, J., Gu, Q., & Han, J. (2020). Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. *Neuroscience*, *424*(November), 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.10.050>
- Weber A., Wasiliew P., & Kracht M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science signaling*, *3*(105). <https://doi.org/doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>
- Wikberg, J. E. S., Muceniece, R., Mandrika, I., Prusis, P., Lindblom, J., Post, C., & Skottner, A. (2000). New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacological Research*, *42*(5), 393-420. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0725>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, *49*, 1304-1313. <https://doi.org/doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- Wong, K. Y., Rajora, N., Boccoli, G., Catania, A., & Lipton, J. M. (1997). A potential mechanism of local anti-inflammatory action of alpha-melanocyte-stimulating hormone within the brain: modulation of tumor necrosis factor-alpha production by human astrocytic cells. *Neuroimmunomodulation*, *4*(1), 37-41. <https://doi.org/doi.org/10.1159/000097313>

- Yang, X., Zheng, M., Hao, S., Shi, H., Lin, D., Chen, X., Becvarovski, A., Pan, W., Zhang, P., Hu, M., Huang, X. F., Zheng, K., & Yu, Y. (2020). Curdlan Prevents the Cognitive Deficits Induced by a High-Fat Diet in Mice via the Gut-Brain Axis. *Frontiers in Neuroscience, 14*, 384. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00384>
- Yang, Y. L., Liu, M., Cheng, X., Li, W. H., Zhang, S. S., Wang, Y. H., & Du, G. H. (2019). Myricitrin blocks activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways to protect nigrostriatum neuron in LPS-stimulated mice. *Journal of Neuroimmunology, 337*, 577049. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577049>
- Zaletel, I., Filipović, D., & Puškaš, N. (2017). Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. *Reviews in the Neurosciences, 28*(6), 675-692. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0072>
- Zhang, L., Dong, L., Liu, X., Jiang, Y., Zhang, L., Zhang, X., Li, X., & Zhang, Y. (2014).  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone protects retinal vascular endothelial cells from oxidative stress and apoptosis in a rat model of diabetes. *PLoS ONE, 9*(4), e93433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093433>
- Zhang, Q., Jin, K., Chen, B., Liu, R., Cheng, S., Zhang, Y., & Lu, J. (2022). Overnutrition Induced Cognitive Impairment: Insulin Resistance, Gut-Brain Axis, and Neuroinflammation. *Frontiers in Neuroscience, 16*, 884579. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.884579>
- Zhou, Z., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2019). The astrocytic cAMP pathway in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences, 20*(3), 779. <https://doi.org/10.3390/ijms20030779>
- Zhu, G., Wang, X., Chen, L., Lenahan, C., Fu, Z., Fang, Y., & Yu, W. (2022). Crosstalk Between the Oxidative Stress and Glia Cells After Stroke: From Mechanism to Therapies. *Frontiers in Immunology, 13*, 852416. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.852416>

# **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**



**Artículo publicado:**

**“Memory consolidation impairment induced by Interleukin-1 $\beta$  is associated with changes in hippocampal structural plasticity”**. 2019. Herrera, G., Calfa, G., Schiöth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, Behavioural Brain Research. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111969>

**Artículos en preparación:**

**“The modulatory role of  $\alpha$ -MSH in hippocampal-dependent memory impairment, synaptic plasticity changes, hippocampal oxidative stress, and astrocyte reactivity induced by short-term high-fat diet intake”**. Guadalupe Herrera, M. Jazmín Silvero C., M. Cecilia Becerra, Mercedes Lasaga, Teresa Scimonelli.

**“Effect of nanoparticles with NDP-MSH on cognitive deficit and anxiety induced by high-fat diet intake”**. Herrera, G., Onnainty, R., Granero, G., Scimonelli, T.

**“Advances in quantitative liquid chromatography mass spectroscopy for hypothalamic melanocortin hormones quantification”**. Onnainty R, Herrera G, Scimonelli TN, Granero GE.

**Presentaciones a congresos nacionales e internacionales:**

- 6ta Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa 2020+1). VIRTUAL. Noviembre 2021. **“Protective effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in cognitive impairment and oxidative stress associated with the consumption of a high-fat diet”**. Guadalupe Herrera, M. Jazmín Silvero C., Mercedes Lasaga, Teresa Scimonelli, María Cecilia Becerra.

- XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. VIRTUAL. Octubre 2021. **“Effect of short term high-fat diet in contextual fear memory and structural plasticity. Possible modulation by alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)”**. Herrera Guadalupe, Lasaga Mercedes, Scimonelli Teresa.

- XXXV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. VIRTUAL. Octubre 2020. **"Alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) modulation of the impairment in contextual fear memory induced by High-fat diet consumption, possible glial change"**. Herrera Guadalupe, Lasaga Mercedes, Scimonelli Teresa.
- XXXIV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Villa Carlos Paz, Argentina. Octubre 2019. **"High-fat diet consumption for a short period sensitizes SNC to mild immune challenge and impaired contextual fear memory"**. Herrera Guadalupe, Lasaga Mercedes, Scimonelli Teresa.
- XXXIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Córdoba Capital, Argentina. Octubre 2018. **"Effect of short and long term high-fat diet on contextual fear memory"**. Herrera Guadalupe, Lasaga Mercedes, Scimonelli Teresa.
- XXXII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Mar del Plata, Argentina. Septiembre 2017. **"Neuroinflammation induces memory consolidation impairment that could be associated with changes in hippocampal structural plasticity"**. Herrera Guadalupe, Calfa Gaston, Lasaga Mercedes, Scimonelli Teresa.
- Second FALAN Congress. XXXI Annual Congress of the Argentinean Society for Research in Neuroscience. Buenos Aires, Argentina. Octubre 2016. **"The memory consolidation impairment induced by Interleukin-1 $\beta$  could be associated to changes in hippocampal structural plasticity"**. Herrera Guadalupe, Calfa Gaston, Machado Ivana; Lasaga Mercedes, Scimonelli Teresa.