

**Universidad CEU San Pablo**  
**CEINDO – CEU Escuela Internacional de**  
**Doctorado**

**PROGRAMA en CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD**



**CEU**

*Escuela Internacional  
de Doctorado*

**Efecto de la tributirina sobre la  
memoria espacial, la transmisión  
glutamatérgica hipocampal y la  
plasticidad sináptica**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

**Ana Belén Sanz Martos**

Dirigida por

**Dra. Nuria del Olmo Izquierdo**

**Dr. Mariano Ruiz Gayo**

MADRID, 2022





# CEU

*Universidad  
San Pablo*

Dña. Nuria del Olmo Izquierdo, profesora titular del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) y D. Mariano Ruiz Gayo, catedrático del Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo,

#### HACEN CONSTAR:

Que Dña. Ana Belén Sanz Martos ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Efecto de la tributirina sobre la memoria espacial, la transmisión glutamatérgica hipocampal y la plasticidad sináptica” con objeto de obtener el Grado de Doctor, y que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Madrid, a 24 de febrero de 2022

Nuria del Olmo Izquierdo

Mariano Ruiz Gayo



Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2016-78556R), el Fondo Europeo de Desarrollo Regional y la Fundación Universitaria San Pablo-CEU. Ana Belén Sanz Martos ha sido beneficiaria de una ayuda para la contratación de ayudantes de investigación y técnicos de laboratorio cofinanciada por el Fondo Social Europeo a través del Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI), desde enero de 2019 hasta enero de 2020.



*“Hace treinta años que me propuse conseguir un objetivo científico muy ambicioso. Me recordaron que, durante veinte años, los mejores laboratorios de todo el mundo lo habían intentado sin éxito. Añadieron que cómo iba a conseguirlo entonces una chica perdida en un remoto laboratorio de Oriente Medio.”*

*Ada Yonath. Premio Nobel de Química en 2009*



## AGRADECIMIENTOS

---

Cuando estaba en mi primer año de Psicología, descubrí que quería estudiar el cerebro. Fue gracias a Inmaculada Crespo, mi profesora de Psicobiología. Ella empezó a explicar el desarrollo del Sistema Nervioso, y lo hacía con tanta pasión que sembró en mí el entusiasmo y la curiosidad por las Neurociencias. Probablemente no te acuerdes de mí, pero eres la primera persona a la que tengo que agradecer haber llegado hasta aquí.

Desde ese momento, tuve claro que quería ser Doctora, y seguí formándome para conseguirlo. Años después, cuando llegó el momento de embarcarme en este capítulo de mi vida, apareció otra mujer en mi camino, Nuria del Olmo, mi directora de Tesis. Sin duda este apartado podría dedicártelo a ti, pero sabes que me quedo sin palabras cuando se trata de agradecerte todo lo que has hecho por mí. Me aceptaste en tu grupo sin pensártelo, y me has acompañado estos años de muchas maneras diferentes. Me has formado como investigadora, enseñándome lo que ahora es una de mis pasiones, la electrofisiología. Me has enseñado a decir sí a todos los retos que se me pongan delante, a ser fuerte, a no tirar nunca la toalla por muy difícil que resulte la situación. Todas esas cualidades las vi en ti desde que nos conocimos y por ello, eres una de las personas a las que más admiro. Eres un ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por eso eres la gran científica que eres hoy, por ser una luchadora y por dejarte la piel en todo lo que haces y por todos los que te rodean. Gracias por enseñarme cómo hacer ciencia. Pero no solo has sido mi maestra, también has sido mi amiga. Me has aconsejado y apoyado en situaciones difíciles, y siempre me has hecho sentir que puedo contar contigo para cualquier cosa. Eres un referente para mí, espero haber estado a la altura. Gracias por estos años, no pude haber tenido más suerte aquel día que, tan perdida, llamé a tu puerta. Tenías razón, “todo llega”.

Así, comencé este viaje que es el Doctorado. Llegué a un laboratorio con mucha ilusión, pero sin grandes conocimientos técnicos, y allí conocí a la siguiente mujer que me acompañó en este camino, Ana Contreras. Mi hermana mayor científica y a la que le debo el haber aprendido casi todo lo que sé hacer. Gracias por estar en el momento y en el lugar, gracias por tu paciencia conmigo, por todas las horas de experimentos que hemos compartido y por enseñarme que ser rigurosa en nuestro trabajo es una de las cosas más importantes. Siempre decimos que he seguido tus pasos, y menos mal, sin duda eran los mejores pasos a los que seguir. Ahora sí, “esto ya está hecho”.

Durante esta etapa, conocí a mi Rori y a Adri, la extraña pareja. Vosotros erais la alegría del laboratorio, me acogisteis y me hicisteis sentir parte de todo. Hemos vivido muchos momentos y todos divertidos. Sois dos personas admirables, como científicos y como amigos, y quiero que forméis parte de mi vida para siempre. La siguiente pareja a la que quiero agradecer el haberme acompañado estos años es Raquel y Rosalía. Voy a echar de menos las confesiones en el cuartito de la electro y las conversaciones sobre nuestras dolencias propias de la edad. Gracias por hacerme tanto sonreír. Por último, la tercera pareja, Jesús y Laura. Jesús, contigo he compartido todo el Doctorado, de principio a fin. Hemos estado juntos en lo bueno y en lo malo, en nuestros grandes logros y también en nuestras grandes caídas. Gracias por estar conmigo cuando más he llorado, por dejarme estar contigo cuando más has llorado tú y por estar juntos cuando hemos terminado llorando de la risa. Espero que este no sea el final de nuestra historia porque quiero ver cómo consigues todo lo que te propongas. Laura, tú has llegado un poquito más tarde a mi vida, pero en uno de los mejores momentos. Gracias por tu empatía y por comprenderme mejor que muchos que me conocen de antes. Ha sido una suerte conocerte y espero verte crecer y llegar hasta donde quieras.

Me he rodeado de compañeros increíbles, pero no he tenido menos suerte con mi grupo de investigación. En primer lugar, Mariano, mi director de Tesis. Gracias por acompañarme estos cuatro años y por todo lo que me has enseñado. Por tus charlas en el laboratorio, no solo sobre los experimentos, hablar contigo siempre ha supuesto saber un poquito más sobre cómo funciona realmente el mundo de la ciencia y la investigación. Verte aparecer sabía que supondría llevarme un valioso consejo para tomar mejores decisiones. Gracias Mariví, por hacer más divertidas las reuniones y los cafés; Bea, por escucharme cuando lo he necesitado y por dejarme los mejores bizcochos en mi cuartito por las mañanas. Espero que tus pendientes me den suerte. Y Lidia, ha sido un placer poder trabajar juntas, gracias por enseñarme un poquito de lo mucho que sabes.

No puedo olvidar a tres grandes personas que forman parte del Departamento de Farma-Toxi, Gonzalo, Esther y Marti. Gracias por amar lo que hacéis y por hacer tan fácil que el resto nos contagiemos de vuestro espíritu científico.

Una vez transcurrida esta primera etapa, comenzó una segunda en el Departamento de Psicobiología de la UNED. Aquí he conocido personas que han hecho que sienta el laboratorio como mi casa desde el primer día. En primer lugar, Emilio Ambrosio, tú hiciste posible esta oportunidad que tanto me ha permitido aprender. Gracias por tus consejos y tus bocadillos los días en los que era imposible parar a comer. Gracias Alejandro, siempre me has hecho sentir una más,

incluyéndome en los seminarios, charlas y ahora, como miembro de tu equipo docente. Eres de los mejores científicos que conozco y a los que me quiero parecer. Gracias Alberto, por estar para todos, por tu generosidad infinita y por hacer las comidas tan divertidas enseñándonos palabras olvidadas. Marcos, gracias por estar dispuesto a ayudar siempre, y por esparcir tu buen humor estés donde estés. Y por supuesto, gracias a mi *Lab Meeting*, Mario, Lucía y Shishir. Gracias por todo lo que me habéis ayudado, enseñándome protocolos, haciendo galletas o montando laberintos, pero, sobre todo, gracias por cada caña que nos hemos tomado. Hemos recorrido bares desde la Dehesa hasta Vallecas. Esos ratitos después de meter ratas en cajas de Skinner, o hacer estadísticas imposibles, o recolectar salivas durante interminables horas, no los cambio por nada. Ojalá sigamos arreglando el mundo muchísimos años más. Shishir, especialmente a ti tengo que agradecerle las infinitas horas que hemos compartido, la mayoría de las cuales han sido repletas de risas. Empezamos con mal pie, pero terminamos este viaje juntos, y eso es precioso.

No puedo estar más agradecida con las personas que me han acompañado todo este tiempo, y no solo han sido del laboratorio. Tengo mucho que agradecer a mis amigos, Carlos, Alba, Andrea, Laura, Víctor y More y a mi hermana, María. Vosotros habéis sido parte de este camino, habéis sufrido conmigo mis peores momentos y os habéis alegrado, incluso más que yo, de los mejores. Todos vosotros me inspiráis, porque lucháis cada día por conseguir vuestros objetivos, y sois increíbles en lo que hacéis. Gracias por formar parte de vida, nunca os dejaré escapar. Gracias a ti Miguel, por ser la primera persona en confiar en mí, y seguir haciéndolo más que yo misma, por verme capaz de cosas que parecen imposibles. Tienes mucha culpa de que haya podido cumplir este sueño, y te estaré siempre agradecida.

Por último, no pueden faltar en estas hojas las personas que me han acompañado desde que tengo memoria, mis padres. Papá, gracias por todo lo que me has enseñado a lo largo de mi vida, como el valor del esfuerzo. Ningún mal resultado es importante si en el proceso de conseguirlo te has esforzado al máximo. Siempre me has enseñado a ver la vida desde otro prisma y es precisamente eso lo que me hace seguir intentando alcanzar mis sueños. Y si al principio empecé hablando de mujeres a las que admiro, termino de la misma manera. Gracias mamá, porque he visto lo que te has esforzado para conseguir todas las cosas que te has propuesto, y desgraciadamente, nadie te lo ha puesto fácil. Aun así, la perseverancia es algo que me has inculcado siempre, y creo, lo he aprendido. Estoy muy orgullosa de ti y espero que tú también lo estés de mí. Os quiero.

Gracias.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	15
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	17
<b>ABREVIATURAS</b> .....	19
<b>RESUMEN</b> .....	27
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	31
1.1. Ácidos grasos de cadena corta: eje microbiota-intestino-cerebro .....	32
1.2. Receptores de ácidos grasos libres: FFAR2 y FFAR3 .....	37
1.3. Tributirina, un precursor del ácido butírico .....	40
1.4. Aprendizaje y memoria .....	45
1.4.1. Aprendizaje y memoria espacial .....	49
1.4.2. Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial mediante modelos animales .....	51
1.5. El hipocampo.....	54
1.5.1. Estructura y conexiones del hipocampo .....	55
1.5.2. Transmisión hipocampal.....	58
1.5.3. Plasticidad sináptica hipocampal .....	62
1.6. Tributirina, memoria espacial y plasticidad sináptica en el hipocampo.	69
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	75
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	79
3.1. Animales de experimentación .....	79
3.2. Diseño experimental .....	79
3.3. Tratamiento dietético .....	83
3.4. Control del peso corporal e ingesta calórica .....	86
3.5. Valoración de la memoria espacial mediante el laberinto en Y .....	86
3.6. Obtención de las muestras .....	88
3.7. Determinaciones bioquímicas en plasma.....	88
3.7.1. Determinación de la glucosa plasmática.....	88
3.7.2. Determinación de colesterol en plasma .....	88

3.7.3.	Determinación de triglicéridos plasmáticos .....	89
3.7.4.	Determinación de ácidos grasos no esterificados plasmáticos .....	89
3.7.5.	Determinación de los niveles plasmáticos de insulina.....	90
3.7.6.	Determinación de los niveles plasmáticos de leptina .....	90
3.7.7.	Determinación de los niveles plasmáticos de adiponectina .....	91
3.8.	Determinación de lípidos en el tejido adiposo.....	91
3.9.	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa en tiempo real (RT -qPCR) .....	92
3.10.	Detección de proteínas por <i>Western Blot</i> .....	95
3.11.	Registro electrofisiológico para el estudio de la plasticidad sináptica hipocampal.....	97
3.12.	Determinación analítica de aminoácidos en rodajas de hipocampo mediante electroforesis capilar .....	100
3.13.	Análisis estadístico .....	101
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>105</b>
4.1.	Efecto del consumo de TB durante 20 semanas sobre la memoria espacial dependiente del hipocampo .....	106
4.1.1.	Peso corporal e ingesta calórica.....	106
4.1.2.	Bioquímica plasmática.....	109
4.1.3.	Alternancia espontánea en el laberinto en Y.....	109
4.1.4.	Expresión génica en el hipocampo, la corteza prefrontal y el tejido adiposo.....	110
4.2.	Efecto del consumo de TB durante 48 horas sobre la memoria espacial dependiente del hipocampo .....	113
4.2.1.	Peso corporal e ingesta calórica.....	113
4.2.2.	Bioquímica plasmática.....	116
4.2.3.	Alternancia espontánea en el laberinto en Y.....	116
4.2.4.	Expresión génica y proteica en el hipocampo, la corteza prefrontal y el tejido adiposo.....	117
4.3.	Efecto de la TB <i>in vitro</i> en la plasticidad sináptica .....	122

4.4. Efecto de la TB/AB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica .....	136
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>141</b>
5.1. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre el peso corporal, la ingesta calórica y la cantidad de tejido adiposo.....	141
5.2. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre la memoria espacial.....	143
5.3. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre la expresión de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA .....	144
5.4. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre la expresión génica de PPAR $\gamma$ .....	146
5.5. Efecto de la TB <i>in vitro</i> sobre la transmisión glutamatérgica hipocampal y la plasticidad sináptica .....	148
5.6. Discusión general .....	152
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>157</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>161</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta.....	33
<b>Figura 2.</b> Eje microbiota-intestino-cerebro.....	36
<b>Figura 3.</b> Receptores de ácidos grasos libres.....	40
<b>Figura 4.</b> Síntesis del ácido butírico a partir de AcCoA.....	41
<b>Figura 5.</b> Composición de la tributirina.....	45
<b>Figura 6.</b> Esquema de los diferentes tipos de memoria.....	49
<b>Figura 7.</b> Localización del hipocampo.....	54
<b>Figura 8.</b> Esquema de las áreas que forman el sistema hipocampal y sus conexiones internas.....	57
<b>Figura 9.</b> Síntesis de glutamato y ciclo glutamato/glutamina.....	59
<b>Figura 10.</b> Receptores NMDA y AMPA glutamatérgicos.....	62
<b>Figura 11.</b> Potenciación a largo plazo.....	66
<b>Figura 12.</b> Depresión a largo plazo.....	67
<b>Figura 13.</b> Diseño experimental.....	82
<b>Figura 14.</b> Laberinto en Y.....	87
<b>Figura 15.</b> Esquema del registro electrofisiológico en rodajas de hipocampo y representación de la señal obtenida durante la línea base y tras la inducción de la LTP.....	99
<b>Figura 16.</b> Peso corporal e ingesta calórica tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	107
<b>Figura 17.</b> Determinación de lípidos en el TAS tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	108
<b>Figura 18.</b> Alternancia espontánea durante y tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	110

<b>Figura 19.</b> Expresión génica en el TAS y TAE tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	112
<b>Figura 20.</b> Peso corporal e ingesta calórica tras las dietas con TB durante 48 horas.....	114
<b>Figura 21.</b> Determinación de lípidos en el TAS tras las dietas con TB durante 48 horas.....	115
<b>Figura 22.</b> Alternancia espontánea tras las dietas con TB durante 48 horas.....	117
<b>Figura 23.</b> Expresión génica en el hipocampo tras las dietas con TB durante 48 horas.....	119
<b>Figura 24.</b> Expresión proteica de las subunidades de los receptores de glutamato AMPA y NMDA en el hipocampo tras las dietas con TB durante 48 horas.....	121
<b>Figura 25.</b> Efecto de la TB sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampal.....	123
<b>Figura 26.</b> Efecto de la TB en presencia de inhibidores de PPAR $\gamma$ , AMPK y NMDAR.....	126
<b>Figura 27.</b> Efecto de la TB sobre el deterioro de la LTP inducido por SCOP.....	127
<b>Figura 28.</b> Efecto de la TB sobre el deterioro de la LTP inducido por AEA.....	129
<b>Figura 29.</b> Efecto de la TB en rodajas de hipocampo de animales tratados con dietas SOLF y UOLF durante 8 semanas.....	131
<b>Figura 30.</b> Efecto de la TB en rodajas de hipocampo de animales tratados con dietas SOLF y UOLF durante 2 horas.....	134
<b>Figura 31.</b> Efecto del AB sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampal.....	135
<b>Figura 32.</b> Electroferograma de rodajas de hipocampo incubadas con TB y AB.....	136

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Composición de las dietas con TB.....	83
<b>Tabla 2.</b> Tratamiento dietético con TB durante 20 semanas (grupo 1) .....	84
<b>Tabla 3.</b> Tratamiento dietético con TB durante 48 horas en animales adolescentes (grupo 1) .....	84
<b>Tabla 4.</b> Tratamiento dietético con TB durante 48 horas en animales adolescentes y adultos (grupo 2) .....	85
<b>Tabla 5.</b> Tratamiento dietético (crónico y agudo) con dietas altas en grasas saturadas (SOLF) e insaturadas (UOLF) .....	85
<b>Tabla 6.</b> Secuencias de los <i>primers</i> utilizados para medir los diferentes genes de interés mediante RT-qPCR.....	94
<b>Tabla 7.</b> Características de los anticuerpos utilizados para cuantificar las proteínas de interés mediante <i>Western Blot</i> .....	97
<b>Tabla 8.</b> Peso de los tejidos extraídos tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	108
<b>Tabla 9.</b> Parámetros bioquímicos plasmáticos tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	109
<b>Tabla 10.</b> Expresión génica en el hipocampo y la CPF tras las dietas con TB durante 20 semanas.....	111
<b>Tabla 11.</b> Ingesta total (g y kcal) durante las 48 horas de tratamiento con las dietas de TB en animales adolescentes y adultos.....	114
<b>Tabla 12.</b> Peso de los tejidos periféricos extraídos tras las dietas con TB durante 48 horas.....	115
<b>Tabla 13.</b> Parámetros bioquímicos plasmáticos tras las dietas con TB durante 48 horas.....	116
<b>Tabla 14.</b> Expresión génica en la CPF tras las dietas con TB durante 48 horas.....	120

<b>Tabla 15.</b> Expresión génica en el TAS y el TAE tras las dietas con TB durante 48 horas.....	121
<b>Tabla 16.</b> Efecto de la TB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica.....	137
<b>Tabla 17.</b> Efecto del AB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica.....	138

## ABREVIATURAS

---

18s	ARN ribosomal 18s
AB	Ácido butírico
AcCoA	Acetil-Coenzima A
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
<i>Adipoq</i>	Adiponectina
AEA	Anandamida
AGCC	Ácido graso de cadena corta
AMPA	Receptor ionotrópico de Glu ( <i>ácido <math>\alpha</math>-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolepropiónico</i> )
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AP-5	Antagonista selectivo de receptores NMDA ( <i>ácido 2-amino-5-fosfonovalérico</i> )
<i>Aqp7</i>	Acuaporina 7
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asp	Aspartato
ATP	Adenosín trifosfato
$\beta$ A	$\beta$ -amiloide
BXA	Ácido bicinconínico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina
C-C	Compuesto-C
CA	Cuerno de Ammon
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /calmodulina proteína quinasa
CE	Corteza entorrinal
CPF	Corteza prefrontal
Ct	Ciclo umbral
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatorios
EEM	Error estándar de la media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas
e-LTP	Potenciación a largo plazo temprana ( <i>early LTP</i> )

EP	Enfermedad de Párkinson
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
FFAR	Receptor de ácidos grasos libres
fEPSP	Potencial postsináptico excitatorio de campo
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GD	Giro dentado
GLAST	Transportador de Glu y aspartato (EAAT1)
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
Gly	Glicina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
<i>Gria1</i>	Gen que codifica la subunidad 1 del receptor AMPA
<i>Gria2</i>	Gen que codifica la subunidad 2 del receptor AMPA
<i>Grin1</i>	Gen que codifica la subunidad 1 del receptor NMDA
<i>Grin2A</i>	Gen que codifica la subunidad 2A del receptor NMDA
<i>Grin2B</i>	Gen que codifica la subunidad 2B del receptor NMDA
GW9662	Antagonista PPAR $\gamma$
HDAC	Histona desacetilasa
HF	Dieta alta en grasa ( <i>high fat</i> )
HFS	Estimulación de alta frecuencia
<i>Hsl</i>	Lipasa sensible a hormonas
IL	Interleuquina
<i>I/O</i>	<i>Input/Output</i>
i.p.	Intraperitoneal
IS	Estándar interno; ácido amino adipídico
kcal	Kilocaloría
KRB	Tampón Krebs
LCR	Líquido cefalorraquídeo
<i>Lep</i>	Leptina
LFE	Estimulación de baja frecuencia
<i>-LTP</i>	Potenciación a largo plazo tardía ( <i>late LTP</i> )
<i>Lpl</i>	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCT	Transportadores de monocarboxilato

mGluR	Receptor de glutamato metabotrópico
N	Número de animales por grupo
NBD-F	Fluoróforo; <i>pro-fluorescent reagent</i>
NEFA	Ácidos grasos libres no esterificados
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	Receptor ionotrópico de Glu (N-metil-D-aspartato)
n.s.	No significativo
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PPAR	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
RAM	Laberinto radial de ocho brazos
r.p.m	Revolución por minuto
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SCOP	Escopolamina
Ser	Serina
SD	Dieta estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SOLF	Dieta alta en grasas saturadas ( <i>Saturated-Oil Food</i> )
SUB	Subículo
TAE	Tejido adiposo epididimal
TAL	Tejido adiposo lumbar
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
Tau	Taurina
TB	Tributirina
TMB	3.3'-5.5'-tetrametilbenzidina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
T <sub>reg</sub>	Células T reguladoras
UOLF	Dieta alta en grasas insaturadas ( <i>Unsaturated-Oil Food</i> )
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato



## RESUMEN





## RESUMEN

---

Los ácidos grasos de cadena corta, derivados de la fermentación intestinal de la fibra alimentaria y contenidos en los productos lácteos, están ganando interés en relación con sus posibles efectos beneficiosos en el tratamiento de determinadas enfermedades degenerativas y trastornos psicológicos. Específicamente, se ha demostrado que la administración de uno de ellos, el ácido butírico/butirato, revierte ciertas alteraciones de la memoria a largo plazo en animales de laboratorio. Con el fin de profundizar en los posibles mecanismos implicados en este efecto, en esta Tesis Doctoral hemos estudiado el efecto de la tributirina, un precursor del ácido butírico, sobre i) la memoria espacial dependiente del hipocampo, ii) los mecanismos de transmisión y plasticidad sináptica hipocampales que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria y iii) la expresión de genes y proteínas relevantes para la transmisión glutamatérgica hipocampal. Para ello, se han utilizado ratones macho C57BL/6J que consumieron dietas con diferentes concentraciones de tributirina (1% y 3%) durante 48 h. Nuestros resultados muestran que la ingesta de una dieta con un 1% de tributirina prevenía, en ratones adolescentes, pero no en adultos, el deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo inducido por escopolamina. Además, la ingesta de tributirina aumentó, en el hipocampo adolescente, la expresión génica de los receptores *Pparg* y de adiponectina, así como la de las subunidades de los receptores de glutamato (AMPA-2, NMDA-1, NMDA-2A y NMDA-2B). Estos cambios son específicos del hipocampo ya que no se observaron otras áreas estudiadas como la corteza prefrontal. Por otro lado, se llevaron a cabo estudios *in vitro* en rodajas de hipocampo de ratones macho C57BL/6J adolescentes que revelaron que tanto la tributirina como el ácido butírico transforman un fenómeno de plasticidad sináptica, como la potenciación de larga duración temprana, en un fenómeno de mayor duración, como es la potenciación de larga duración tardía, poniendo de manifiesto la modulación de la plasticidad sináptica hipocampal por tributirina/ácido butírico. Se ha

demostrado además que este mecanismo es dependiente de PPAR $\gamma$  y de AMPK. Además, la perfusión de rodajas de hipocampo con tributirina revirtió la inhibición de la LTP inducida por otras moléculas como la escopolamina y la anandamida, así como el deterioro de este fenómeno de plasticidad sináptica inducido por dietas ricas en grasas saturadas.

En conclusión, nuestro estudio sugiere que la tributirina interfiere con los procesos de transmisión y plasticidad sináptica hipocampales, lo que podría justificar sus efectos beneficiosos sobre el deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo. PPAR $\gamma$  y AMPK podrían ser las dianas responsables de estos efectos.

# INTRODUCCIÓN





# 1. INTRODUCCIÓN

---

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), derivados de la fermentación intestinal de la fibra alimentaria y contenidos en los productos lácteos, están cobrando un interés creciente en relación con sus posibles efectos beneficiosos en diversas patologías del sistema nervioso central (SNC). Estas moléculas presentan receptores específicos en el cerebro (Ang y cols., 2018), lo que pone de manifiesto la interacción entre las comunidades bacterianas residentes en la microbiota intestinal y la formación y la función de los sistemas neurobiológicos (Morais, Schreiber, y Mazmanian, 2021).

En los últimos años se ha desarrollado en gran medida el estudio del papel de la microbiota, compuesta por los millones de microorganismos que existen en nuestro cuerpo, como uno de los reguladores clave del nuevo eje llamado **eje microbiota-intestino-cerebro**, que parece tener un papel determinante en las bases biológicas y fisiológicas de los trastornos psiquiátricos, del neurodesarrollo, relacionados con la edad y neurodegenerativos (Cryan y cols., 2019).

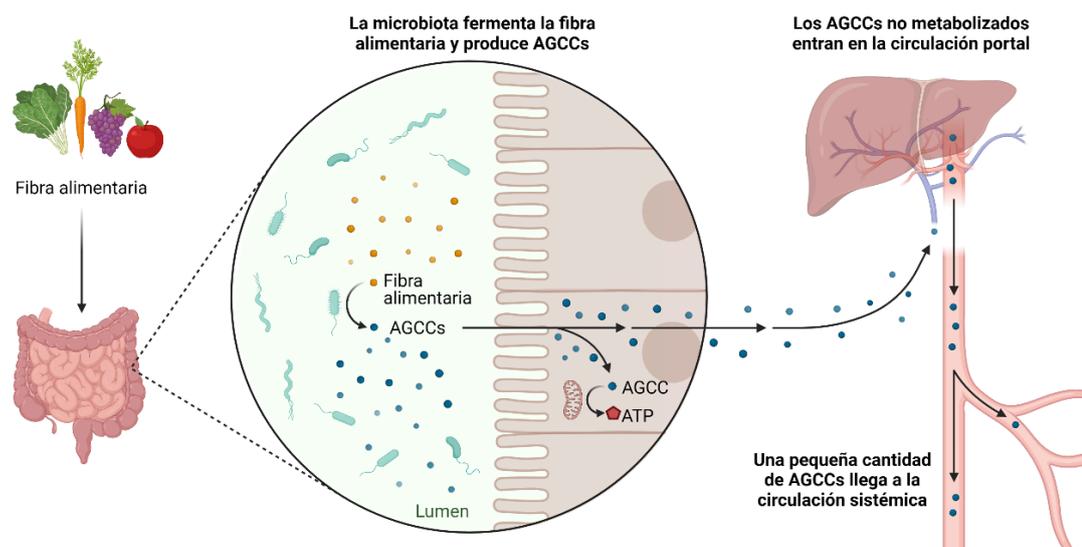
Estudios recientes han sugerido que el desequilibrio en las bacterias intestinales puede ser responsable de determinadas enfermedades ya que existe una comunicación bidireccional entre la microbiota y algunos órganos, que parece ser clave en la homeostasis de los organismos (Borre y cols., 2014). Así, diversos autores han demostrado que los AGCC producidos por la microbiota intestinal están involucrados, además de en la fisiología gastrointestinal, en la función inmune, el metabolismo y el desarrollo y correcto funcionamiento del SNC (Guan y cols., 2009). Sin embargo, aunque el estudio de las interacciones microbiota-huésped ha aumentado considerablemente en los últimos años, quedan muchos aspectos por conocer de la compleja comunicación entre los participantes del eje microbiota-intestino-cerebro.

En relación con la función cerebral, una de las funciones en las que parece que los AGCC presentan un papel relevante, es en los procesos de aprendizaje y memoria, en los que la acetilación de histonas se presenta como un factor clave (Korzus, Rosenfeld, y Mayford, 2004; Levenson y cols., 2004; Vecsey y cols., 2007). Así, se ha demostrado que el **ácido butírico/butirato (AB)**, que es un potente inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), restablece la capacidad de aprendizaje y el deterioro de la memoria a largo plazo en ratones con una pérdida neuronal masiva (Fischer y cols., 2007).

Un mayor conocimiento de cómo los AGCC pueden modular estas interacciones complejas microbiota-intestino-cerebro podría apoyar al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y farmacológicas para prevenir el deterioro de la memoria en general y, el causado por enfermedades neurodegenerativas en particular.

### **1.1. Ácidos grasos de cadena corta: eje microbiota-intestino-cerebro**

Los AGCC –acetato, propionato y butirato– son ácidos monocarboxílicos con una longitud de cadena de hasta seis átomos de carbono y son los principales productos de la fermentación anaeróbica por la microbiota intestinal de polisacáridos no digeribles, como la fibra dietética y el almidón resistente (Miller y Wolin, 1996; Louis y Flint, 2009; Morrison y Preston, 2016). Los AGCC son absorbidos por los colonocitos (Vijay y Morris, 2014) y la fracción que no se metaboliza en ellos se transporta a la circulación portal y se utiliza como sustrato energético para los hepatocitos (Schönfeld y Wojtczak, 2016). Por lo tanto, solo una pequeña fracción de acetato, propionato y butirato derivados del colon llega a la circulación sistémica y a otros tejidos (Cummings y cols., 1987) (Figura 1).



**Figura 1. Metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta.** La fermentación intestinal de la fibra alimentaria en el colon produce metabolitos, AGCC (acetato, propionato y butirato). La mayoría de ellos se metabolizan por los colonocitos y se transportan a la circulación portal. Los restantes pasan a la circulación sistémica y otros tejidos (figura realizada utilizando la web Biorender).

Uno de los efectos mejor documentados de los AGCC, y en particular del AB, es el efecto antiinflamatorio (Arpaia y cols., 2013; Smith y cols., 2013; Haghikia y cols., 2015). Además, estos ácidos grasos podrían tener un efecto protector sobre algunos procesos relacionados con la obesidad, ya que participan en la regulación de la lipogénesis hepática, la diferenciación de adipocitos, la homeostasis energética (Canfora, Jocken, y Blaak, 2015) y el control del apetito (Li y cols., 2018).

Como ya se ha mencionado, el mecanismo por el cual los AGCC regulan las funciones sistémicas es a través de la inhibición de a HDAC, promoviendo así la acetilación de los residuos de lisina presentes en las histonas nucleosómicas en varias poblaciones celulares. Este mecanismo de señalización intracelular se ha encontrado tanto en el intestino como en el SNC (Stilling y cols., 2016).

Además de los efectos locales que los AGCC ejercen en los tejidos periféricos, parece que también desempeñan funciones fundamentales en la diafonía microbiota-intestino-cerebro.

La microbiota es el conjunto de bacterias que habitan en el organismo y que coloniza la piel y varias cavidades mucosas, pero es en el tracto gastrointestinal donde estos organismos son extremadamente abundantes, pues millones de bacterias, hongos y virus coexisten en simbiosis con el huésped para un potencial beneficio mutuo (Hooper, Littman, y Macpherson, 2012; Lynch y Pedersen, 2016; Erny y cols., 2017). El interés por la microbiota intestinal es relativamente reciente, y se están comenzando a dilucidar sus funciones fundamentales en la protección contra patógenos, la regulación de las funciones metabólicas, endocrinas e inmunitarias y la influencia en el metabolismo y la absorción de fármacos (Dalile y cols., 2019). Además, recientemente se ha revelado su influencia en la comunicación bidireccional entre el aparato digestivo y el SNC, que parece indicar que la microbiota intestinal ejerce una profunda influencia en procesos cerebrales clave, lo que está llevando al desarrollo del concepto de eje microbiota-intestino-cerebro (Cryan y cols., 2019).

Los mecanismos involucrados en la dicotomía microbiota-cerebro aún no se han dilucidado por completo, pero se proponen diversas vías potenciales, a través de las cuales la microbiota intestinal puede influir en la función cerebral (Borre y cols., 2014). Estas incluyen el nervio vago (Forsythe, Bienenstock, y Kunze, 2014), la modulación del sistema inmunológico (Erny y cols., 2015), el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Sudo y cols., 2004), el metabolismo del triptófano (O'Mahony y cols., 2015), la síntesis de algunos neurotransmisores (Fung, Olson, y Hsiao, 2017; Calvani y cols., 2018; Sherwin, Dinan, y Cryan, 2018) y la producción de AGCC (Borre y cols., 2014). Se ha demostrado que los AGCC participan en la función cerebral (Dalile y cols., 2019) produciendo efectos beneficiosos sobre neuronas, microglía y astrocitos (Silva, Bernardi, y Frozza, 2020) y, a menudo, se consideran candidatos clave como mediadores de la comunicación intestino-cerebro, ya que se ha observado una producción alterada de AGCC en una variedad de neuropatologías (Wang y cols., 2012; Skonieczna-Żydecka y cols., 2018).

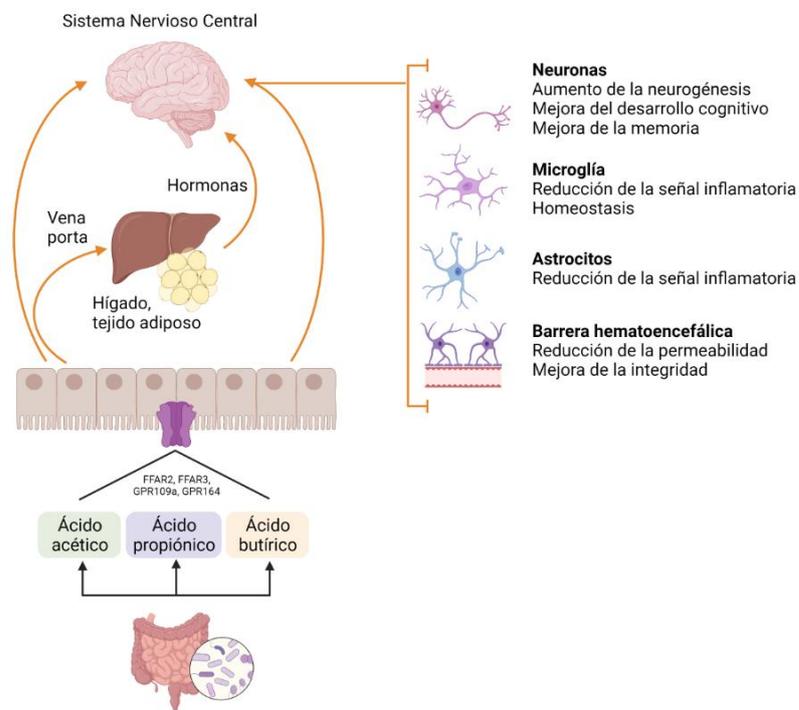
Los AGCC acceden al cerebro cruzando la barrera hematoencefálica (BHE) a través de los receptores de ácidos grasos libres (Silva y cols., 2020), que se describen en el siguiente apartado de este trabajo. Esto se sabe porque los tres metabolitos –acetato, propionato y butirato– se han detectado en el líquido cefalorraquídeo (LCR) humano (0-171  $\mu\text{M}$  para el acetato, 0-6  $\mu\text{M}$  para el propionato y 0-2,8  $\mu\text{M}$  para butirato) (Silva y cols., 2020). Se especula que posiblemente esto ocurre gracias a la abundante expresión de transportadores de monocarboxilato (MCT) en las células endoteliales (Oldendorf, 1973), que hacen que los AGCC puedan funcionar como moléculas de señalización para transmitir el estado del intestino al cerebro (Hu y cols, 2018).

Además, los AGCC parecen desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la BHE. Así se ha observado que ratones libres de gérmenes muestran un aumento de la permeabilidad de la BHE que se corrige cuando se restaura la producción de AGCC mediante la colonización con cepas bacterianas en su microbiota (Braniste y cols., 2014).

Cuando los AGCC cruzan la BHE y llegan al SNC, producen efectos beneficiosos sobre neuronas, microglía y astrocitos (Silva y cols., 2020) (Figura 2). Entre otras acciones, atenúan la activación de la neuroglía en condiciones de neuroinflamación (Soliman, Combs, y Rosenberger, 2013). Además, promueven la plena maduración de la microglía y sus capacidades antiinflamatorias cuando se administran en el agua de bebida (Morais y cols., 2021), lo que se traduce en el alivio del daño de la BHE causado por la ausencia de microbiota, mediante la restauración de las uniones estrechas (Braniste y cols., 2014). De manera similar, se ha observado que el acetato modula *in vitro* la expresión de citoquinas inflamatorias mediante un mecanismo asociado con un aumento de la acetil-coenzima A (AcCoA) cerebral y de la acetilación de histonas y una reducción de la expresión de la interleuquina IL-1 $\beta$  (Soliman y cols., 2013). En cuanto a la función neuronal, los AGCC pueden modular los niveles de neurotransmisores; el acetato parece influir en el patrón de activación

neuronal hipotalámico, ya que su administración intraperitoneal (i.p.) provoca en el núcleo arqueado un aumento de los niveles de glutamato (Glu), glutamina (Gln) y GABA (Frost y cols., 2014). Por otra parte, el propionato y el butirato están implicados en los procesos de señalización celular, pues influyen en el nivel de  $K^+$  intracelular (Oleskin y Shenderov, 2016). Otros autores han demostrado que los AGCC regulan la expresión del gen que codifica la triptófano hidroxilasa, la enzima clave de la biosíntesis de la serotonina, promoviendo su liberación (Clarke y cols., 2014), lo que tiene repercusión en la supervivencia y regeneración neuronal (Wouters y cols., 2007).

Por otro lado, la administración oral, intravenosa o i.p. de AB desencadena cambios en el metabolismo basal de la glucosa en el núcleo accumbens y el hipocampo, así como el aumento de volumen de la capa de células granulares del hipocampo y la neurogénesis (Val-Laillet y cols., 2018), facilitando la consolidación de la memoria a largo plazo y la mejora de la cognición (Levenson y cols., 2004).



**Figura 2. Eje microbiota-intestino-cerebro.** Los AGCC cruzan la BHE a través de la unión a sus receptores (FFAR2, FFAR3) o inhibiendo HDAC, y llegan al SNC produciendo efectos beneficiosos sobre neuronas, microglía, astrocitos y BHE (figura realizada utilizando la web Biorender y adaptada de Silva y cols. 2020).

Es bien sabido que la síntesis de nuevas proteínas es un proceso esencial para que se produzcan cambios a largo plazo en el aprendizaje y la plasticidad sináptica (Dale, Kandel, y Schacher, 1987; Bliss y Collingridge, 1993). La acetilación de la histona H3 en el hipocampo interviene en dichos procesos de síntesis de nuevas proteínas para contribuir a la formación de memoria a largo plazo (Gräff y Tsai, 2013; Val-Laillet y cols., 2018). Curiosamente, la HDAC tiene un efecto supresor de la memoria que puede ser neutralizado por inhibidores de la HDAC, como el AB (Levenson y cols., 2004). Así, varios estudios con animales se han centrado principalmente en el uso de este AGCC, para que, mediante su función inhibitoria de la HDAC, aumente la acetilación de las histonas en el cerebro durante una fase crítica de la formación de la memoria, provocando una mejora de la potenciación a largo plazo (LTP; del inglés *long term potentiation*) (Levenson y cols., 2004; Kim, Leeds, y Chuang, 2009; Zhong y cols., 2014; Garcez y cols., 2018). De esta forma, se señala a los AGCC como moduladores prometedores del aprendizaje y la memoria.

En resumen, el AB podría influir directamente en el cerebro al reforzar la integridad de la BHE, modular la neurotransmisión, influir en los niveles de factores neurotróficos y promover la consolidación de la memoria.

## **1.2. Receptores de ácidos grasos libres: FFAR2 y FFAR3**

Además de ser una fuente de energía, los AGCC son ligandos naturales de un grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), denominados **receptores de ácidos grasos libres (FFAR;** del inglés *free fatty acid receptor*) (Kimura y cols., 2020). Se ha demostrado que el AB activa GPR43 y GPR41, posteriormente renombrados como **FFAR2** y **FFAR3** respectivamente (Bolognini y cols., 2016; Ang y cols., 2018; Mohajeri y cols., 2018). Aunque ambos son activados por AB, la afinidad

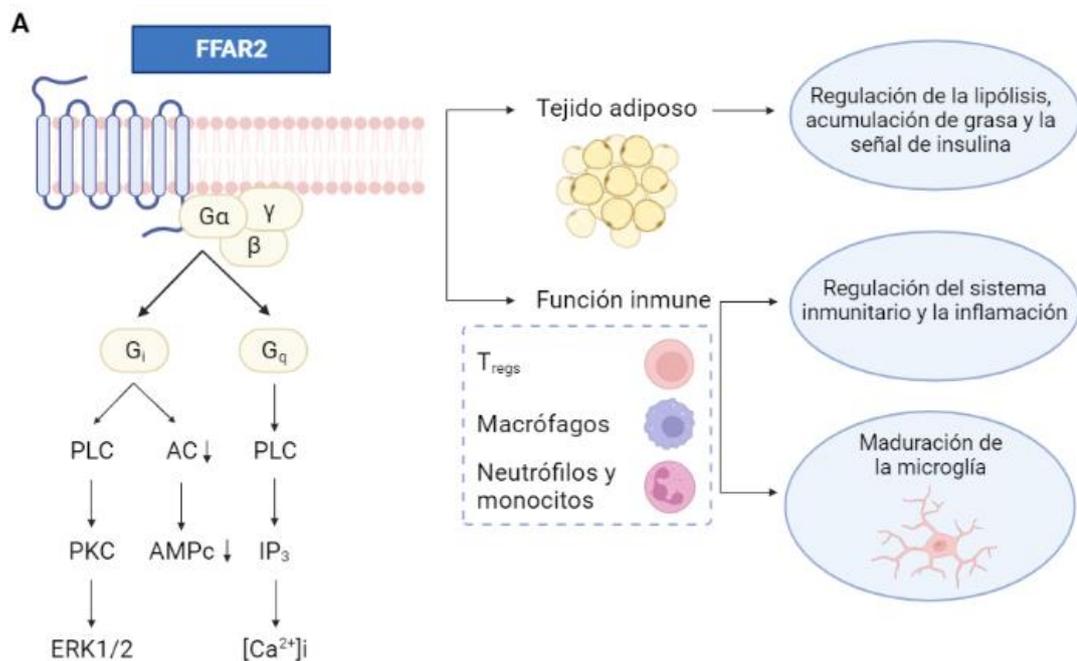
de los AGCC por FFAR2 y FFAR3 difiere con la longitud de los ácidos grasos; mientras que FFAR2 tiene más afinidad por acetato y propionato, FFAR3 muestra preferencia por AB (Lin y *cols.*, 2012; Layden y *cols.*, 2013).

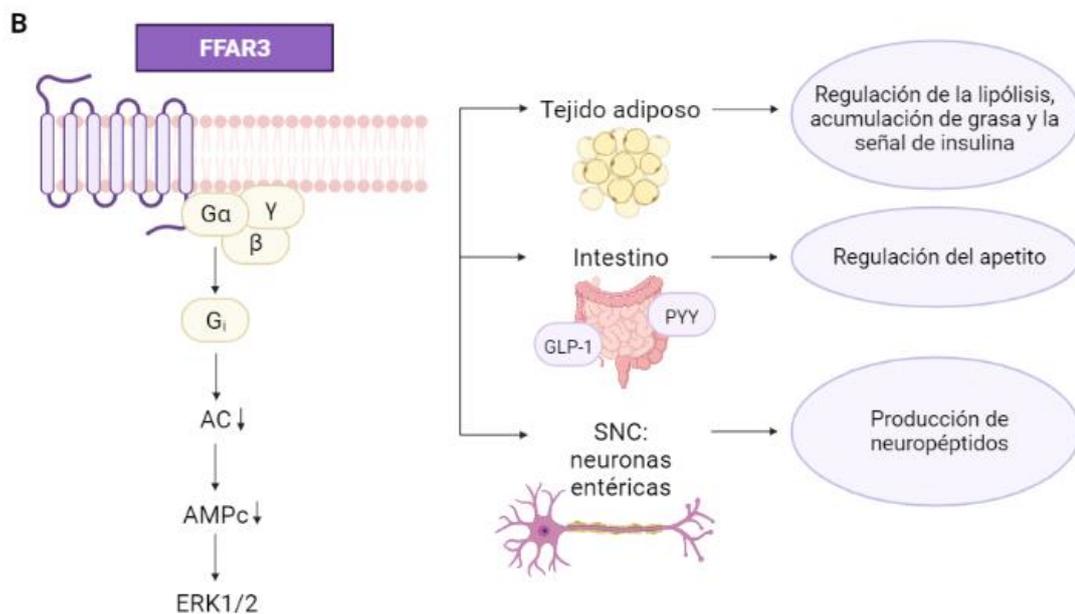
FFAR2 está acoplado a las proteínas  $G_i$  y  $G_q$ . La activación de este receptor por AB a través de proteínas  $G_i$  inhibe la producción de AMPc y activa la cascada ERK, mientras que su activación a través de  $G_q$  resulta en la elevación de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  y promueve la activación de la cascada MAPK (Figura 3A). FFAR3 está acoplado a  $G_i$  y su activación por AB inhibe la producción de AMPc y promueve la fosforilación de ERK1/2 (Figura 3B) (Kimura y *cols.*, 2020). Resultados recientes revelan que FFAR2 y FFAR3 interactúan para formar un heterómero en monocitos y macrófagos primarios humanos, el cual muestra un aumento de la señalización de  $[Ca^{2+}]_i$  al tiempo que pierde la capacidad de inhibir la producción de AMPc y, además, induce la fosforilación de p38, una vía de señalización celular que juega un papel clave en la expresión génica, el crecimiento celular y la inmunidad (Ang y *cols.*, 2018).

Estos receptores están implicados en varios procesos fisiológicos debido a su localización en diferentes tipos celulares. En el tejido adiposo, FFAR2 y FFAR3 actúan como sensores nutricionales manteniendo el equilibrio energético en el cuerpo, promoviendo el gasto de energía y suprimiendo la acumulación de grasa. Esto es posible gracias a la inhibición de la señalización de insulina en el tejido adiposo, cuando los AGCC producidos por la microbiota intestinal son detectados por estos receptores (Miyamoto y *cols.*, 2016). Aunque ambos receptores son reguladores bien establecidos de la respuesta inmune, FFAR2 se ha encontrado, en mayor proporción que FFAR3 (Kim, Park, y Kim, 2014), en neutrófilos y monocitos y, más recientemente, también en las células T reguladoras ( $T_{regs}$ ) (Smith y *cols.*, 2013). Además, FFAR2 inhibe la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, reduciendo así la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 (Kimura y *cols.*, 2020) (Figura 3A). Por otro lado, FFAR3 regula el apetito mediante la activación del péptido de la hormona intestinal YY (PYY) y el

péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) (Figura 3B) (Chambers, Morrison, y Frost, 2015; Baothman y *cols.*, 2016).

En cuanto al SNC, se ha sugerido que las interacciones AGCC-FFAR2/3 son necesarias para el correcto funcionamiento cerebral. Las células inmunitarias periféricas que expresan FFAR2 pueden cruzar la BHE y migrar al cerebro tras la recepción de AGCC a través del plasma circulante del huésped y regular la función o maduración de la microglía en el cerebro (Filiano, Gadani, y Kipnis, 2015; Wang y *cols.*, 2018) (Figura 3A). Por otro lado, FFAR3, se expresa en gran medida en una población de neuronas entéricas, incluidas las neuronas secretoras de los péptidos intestinales vasoactivos (Nøhr y *cols.*, 2013). Estas células que expresan FFAR3 muestran niveles más altos de precursores de neuropéptidos y hormonas neuroendocrinas, lo que indica una asociación entre los AGCC y la producción de neuropéptidos (Nøhr y *cols.*, 2015) (Figura 3B).





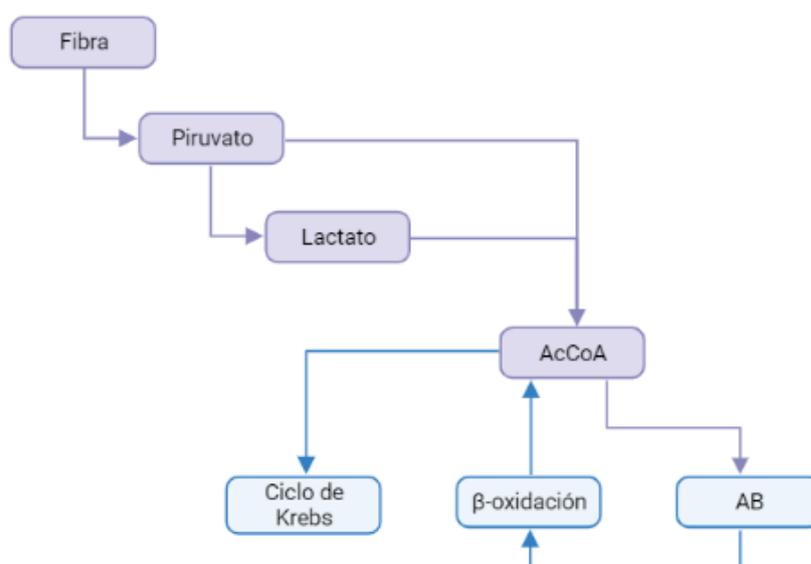
**Figura 3. Receptores de ácidos grasos libres.** Especificidad del ligando y vías de señalización de (A) FFAR2 y (B) FFAR3 (figura realizada utilizando la web Biorender).

### 1.3. Tributirina, un precursor del ácido butírico

El AB es un ácido monocarboxílico saturado formado por cuatro átomos de carbono (ácido butanoico) que, como todos los AGCC, es producto de la fermentación de la fibra alimentaria por parte de las bacterias del colon. El AB también puede ser producido por las lipasas del huésped a partir del triglicérido **tributirina (TB)**, utilizado como precursor para suministrar AB biológicamente activo (Gaschott y cols., 2001, Miyoshi y cols., 2011). La vía de síntesis más extendida es la vía de la AcCoA, en la que ésta se produce a través del piruvato derivado de la fermentación de carbohidratos no digeribles por el huésped (conocidos como "fibra") o a través del lactato (Duncan y cols, 2002; 2004). El AB puede ser utilizado además por las células del huésped, donde se metaboliza en el proceso de  $\beta$ -oxidación mitocondrial, que genera NADH,  $H^+$  y AcCoA, que a su vez puede incorporarse al ciclo del ácido cítrico en la mitocondria (Astbury y Corfe, 2012) (Figura 4).

El AB está presente en los productos lácteos en cantidades considerables (Bugaut, 1987), por ejemplo, en la leche de vaca entera

(~0,1 g/100 g), la mantequilla (~3 g/100 g) y el queso, especialmente el de cabra (~1-1,8 g/100 g) y el parmesano (~1. 5 g/100 g) (Lei, Vacy, y Boon, 2016). También está presente en la leche materna humana, lo que resulta en la absorción diaria de 30 mg/kg aproximadamente para un bebé lactante (Paparo y cols., 2021).



**Figura 4. Síntesis del ácido butírico a partir de AcCoA.** El piruvato, derivado de la fermentación de la fibra alimentaria, y el lactato producen AcCoA dando lugar al AB. El AB puede ser utilizado por las células del huésped, donde se metaboliza en las mitocondrias para dar lugar a NADH, H<sup>+</sup> y AcCoA, que se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Uno de los efectos mejor estudiados del AB es el efecto antiinflamatorio sobre las células microgliales del hipocampo (Huuskonen y cols., 2004). En este sentido, varios estudios han informado que el AB disminuye la activación microglial y la secreción de citoquinas proinflamatorias (Patnala y cols., 2017; Wang y cols., 2018). En experimentos realizados con lipopolisacárido (LPS), se ha observado que el tratamiento con AB *in vitro* e *in vivo* inhibe las modificaciones proinflamatorias inducidas por el mismo (Wang y cols., 2018).

Veíamos en el apartado anterior que los AGCC promueven la acetilación de histonas, modulando así la expresión génica (Vinolo y cols., 2011). La desregulación de la acetilación de histonas se ha relacionado con la alteración de la memoria asociada a la edad y la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Lei y cols., 2016). Por ello, la

administración AB podría constituir una novedosa vía terapéutica para tratar el deterioro de la memoria relacionada con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Govindarajan y cols., 2011). De hecho, se ha observado en estudios preclínicos que el AB produce una reducción de  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) (Lei y cols., 2016). Cabe destacar que los AGCC interfieren con las interacciones proteína-proteína entre los péptidos  $\beta$ A, interrumpiendo así su ensamblaje en oligómeros neurotóxicos (Ho y cols., 2018), las principales toxinas responsables de la disfunción de la sinapsis y los déficits cognitivos en la EA (Ferreira y cols., 2015). Otros estudios han demostrado los efectos beneficiosos del tratamiento con AB y probióticos sobre la cognición y la memoria en un modelo animal de envejecimiento (Garcez y cols., 2018; Ho y cols., 2019), mostrando que la inhibición de la HDAC con AB mejora la función de la memoria y aumenta la expresión de genes implicados en el aprendizaje asociativo (Govindarajan y cols., 2011) frente al daño genético y celular que perjudican la cognición causada por la administración a largo plazo de D-galactosa (Garcez y cols., 2018; Ho y cols., 2019).

Por otro lado, los AGCC juegan un papel importante en la enfermedad de Parkinson (EP). Li y cols. (2017) confirmaron que los pacientes con EP sufren alteraciones en la microbiota y que existe una correlación entre la disminución de AGCC y la progresión de la enfermedad (Li y cols., 2017). Apoyando esta hipótesis, se ha demostrado en modelos animales de EP que la administración de AB mejora el deterioro motor y la deficiencia de dopamina (Liu y cols., 2017; Paiva y cols., 2017).

En el apartado anterior se describía que la inhibición de HDAC por AB mejora procesos de plasticidad sináptica como la LTP y participa en la consolidación de la memoria a largo plazo (Levenson y cols., 2004; Kim y cols., 2009; Zhong y cols., 2014; Garcez y cols., 2018). La eliminación de la microbiota da lugar al deterioro de la neurogénesis en el hipocampo y a deficiencias en la memoria (Möhle y cols., 2016). Este déficit cognitivo podría estar asociado a cambios en la expresión de moléculas de señalización relevantes para la cognición, como el factor neurotrófico

derivado del cerebro (BDNF; del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), la subunidad 2B del receptor glutamatérgico NMDA (N-metil-D-aspartato), el transportador de serotonina y el neuropéptido Y (Fröhlich y cols., 2016). Los factores neurotróficos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF; del inglés *nerve growth factor*), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF; del inglés *glial cell line-derived growth factor*) y el BDNF, que regulan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las neuronas y las sinapsis en el SNC, y desempeñan un papel importante en el aprendizaje y la memoria, también han demostrado estar modulados por AB (Intlekofer y cols., 2013; Savignac y cols., 2013; Varela y cols., 2015).

Además de las enfermedades neurodegenerativas, se han visto efectos beneficiosos del AB sobre diferentes trastornos neurológicos como la depresión (Yamawaki y cols., 2018). El conocimiento actual muestra que este ácido graso posee un efecto antidepresivo que revierte las alteraciones conductuales en modelos de ratón, como la falta de energía (Wei y cols., 2014; Valvassori y cols., 2015), la anhedonia (Sun y cols., 2016), y las deficiencias cognitivas y de sociabilidad (Burokas y cols., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que el AB es capaz de revertir la hiperactividad conductual y los comportamientos depresivos y maníacos en ratas, así como el efecto beneficioso en las fases de manía en un modelo de trastorno bipolar en rata (Moretti y cols., 2011; Valvassori y cols., 2016).

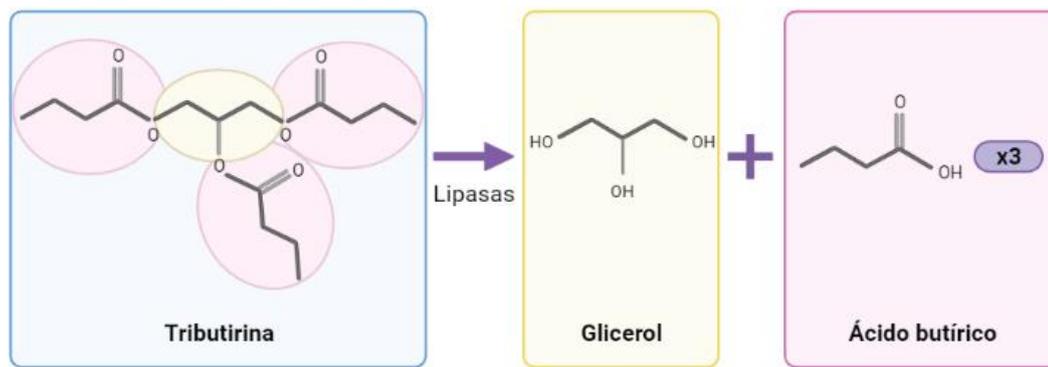
Todos estos datos apuntan a que el AB podría tener un cierto potencial terapéutico en determinadas enfermedades neurodegenerativas y trastornos neurológicos.

Por otro lado, los AGCC muestran efectos positivos sobre varias funciones neuronales relacionadas con los trastornos metabólicos, como la supresión de la actividad de las neuronas orexigénicas que expresan el neuropéptido Y en el hipotálamo (Li y cols., 2018) y la modulación de la señalización desencadenada por el receptor de la grelina (Torres-Fuentes y cols., 2019), lo que contribuye al control del ritmo circadiano y del apetito. En esta línea, estudios recientes sugieren que los cambios en la composición de la microbiota intestinal están estrechamente relacionados

con estos trastornos metabólicos como son la obesidad y la diabetes mellitus tipo II (Tarantino, 2014), implicando la activación de los receptores FFAR2 y FFAR3 en el mecanismo responsable de su control (De Vadder y cols., 2014). Estudios preclínicos sugieren que el tratamiento con AB interviene activamente en la prevención de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad (Frost y cols., 2014; Li y cols., 2018). Además, debido a sus efectos beneficiosos sobre la homeostasis de la glucosa (den Besten y cols., 2015), este ácido graso disminuye el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo II en personas con obesidad (Pelgrim y cols., 2017).

Sin embargo, varios autores han encontrado algunas desventajas en el tratamiento con AB. El principal problema que presenta este ácido graso es su dificultad para alcanzar y mantener sus concentraciones en sangre, debido a su rápida metabolización por los colonocitos (Vinolo y cols., 2012). Además, se ha demostrado la toxicidad del AB en la rata, en la que produce acidosis metabólica sistémica (Egorin y cols., 1999).

La TB (tributirilglicerol o tributirina), precursora del AB (Figura 5), difunde a través de las membranas biológicas y es metabolizada por las lipasas intracelulares, liberando lentamente y de forma prolongada AB terapéuticamente eficaz (Stilling y cols., 2016), proporcionando concentraciones milimolares de AB en el plasma mediante su administración oral (Conley y cols., 1998). En comparación con el AB, la TB tiene una farmacocinética más favorable (Schröder, Eckert, y Maurer, 1998; Egorin y cols., 1999; Heerdt y cols., 1999), es bien tolerada (Conley y cols., 1998; Egorin y cols., 1999) y químicamente estable en plasma (Stilling y cols., 2016).



**Figura 5. Composición de la tributirina.** La TB consiste en tres moléculas de AB unidas a una de glicerol mediante un proceso de esterificación. Ésta difunde a través de las membranas biológicas y se metaboliza por las lipasas intracelulares. Como resultado de la acción de las lipasas, liberan AB en el intestino (figura realizada utilizando la web Biorender).

Se han demostrado los efectos beneficiosos de los tratamientos dietéticos con TB en los perfiles metabólicos e inflamatorios de ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Estos animales, muestran un menor aumento de peso corporal y una mejor respuesta a la insulina (Vinolo y cols., 2011). Además, resultados recientes han mostrado que la TB induce un estado antiinflamatorio en el tejido adiposo reduciendo los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y aumentando IL-10, T<sub>reg</sub> y macrófagos M2 (Sato y cols., 2020).

Debido a estas ventajas frente al AB, la TB es la molécula que hemos utilizado para llevar a cabo los experimentos de la presente Tesis Doctoral que, hasta donde sabemos, es un primer intento de investigar el efecto de la misma sobre los mecanismos subyacentes a determinados procesos cognitivos como la memoria espacial dependiente del hipocampo, así como implicación en la transmisión glutamatérgica hipocampal y en la plasticidad sináptica.

#### 1.4. Aprendizaje y memoria

Uno de los fenómenos psicológicos que más ha despertado el interés y la atención de los científicos desde años atrás es el aprendizaje y con él, la memoria. La memoria es una función cognitiva compleja definida como un conjunto de cambios conductuales causados por la experiencia.

El aprendizaje, sin embargo, es el proceso por el cual se adquiere dicha memoria (Okano, Hirano, y Balaban, 2000).

El estudio científico de la memoria humana comenzó con Herman Ebbinghaus en 1885, quien inició la investigación cuantitativa de los procesos de memoria asociativa tal y como se producen. Ebbinghaus describió las condiciones que influyen en la formación de la memoria y determinó varios principios básicos de la codificación y el recuerdo, como la ley de la frecuencia y el efecto del tiempo en el olvido. Así, las funciones mentales superiores se llevaron al laboratorio (Ebbinghaus, 2013). Paralelamente, una nueva generación de psicólogos experimentales describió las leyes del aprendizaje asociativo en animales. Pavlov, Watson, Hull, Skinner y Tolman, todos ellos conductistas, iniciaron un programa riguroso para identificar las leyes del aprendizaje animal y, a mediados del siglo XX, ya se había desarrollado un lenguaje para los procesos de aprendizaje asociativo (Moser, Rowland, y Moser, 2015).

Los neurobiólogos actuales abordan el estudio de la memoria y el aprendizaje según los fundamentos establecidos por Donald Hebb, quien inició el enfoque moderno de los mecanismos neurales que subyacen a la memoria. En su libro, *The Organization of Behavior* publicado en 1949, Hebb postula: “*Cuando una célula ayuda en repetidas ocasiones a que otra se dispare, en el axón de la primera célula se desarrollan botones sinápticos en contacto con el soma de la segunda célula*” (Hebb, 1949).

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales identificadas como responsable de estos procesos en los vertebrados (Squire y Zola-Morgan, 1991). Esto quedó demostrado en 1957 por Scoville y Milner, cuando realizaron la extirpación de esta estructura a su paciente llamado Henry Gustav Molaison (conocido hasta su muerte en 2008 como paciente H.M.) y observaron la pérdida casi total de su memoria (Scoville y Milner, 1957), descubrimiento con el que comenzó la era experimental moderna. Milner (1962) demostró que su paciente H.M., severamente amnésico, podría aprender una habilidad de coordinación ojo-mano (dibujo en espejo)

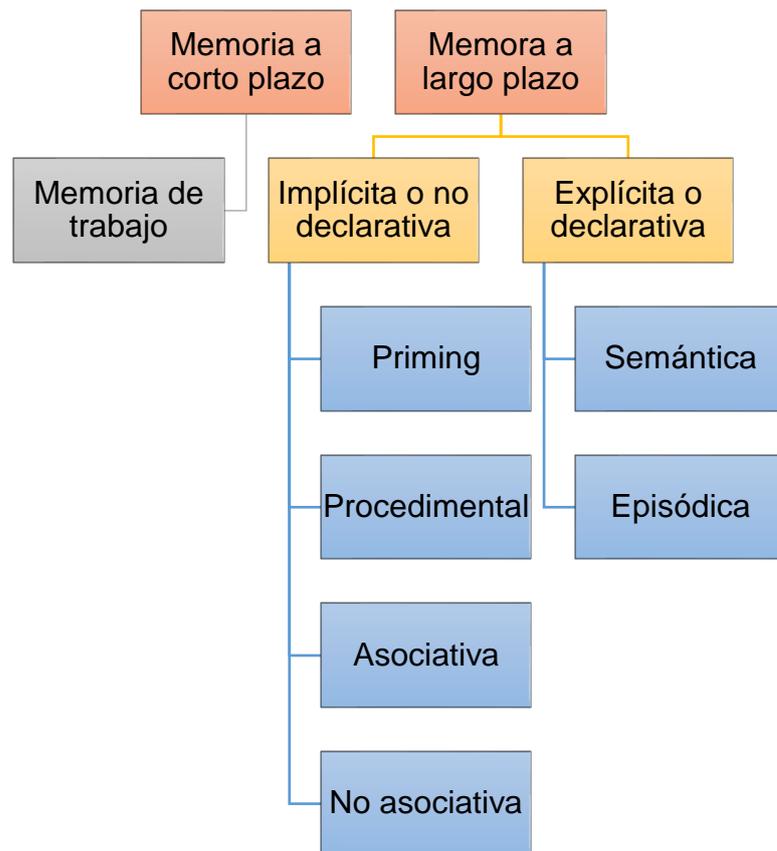
durante un período de días en ausencia de cualquier recuerdo de haber practicado la tarea previamente (Squire, 2009).

El hipocampo parece así tener gran importancia sobre los fenómenos mnemónicos, por lo que era esperable que sus sinapsis tuviesen la capacidad para ser modificadas por un determinado patrón de estímulos. Los investigadores Tim Bliss y Terje Lømo describieron por primera vez, en 1953, el fenómeno de facilitación postsináptica, tras la aplicación de estimulación de alta frecuencia a las neuronas presinápticas del hipocampo de conejo mediante experimentos electrofisiológicos (Bliss y Lømo, 1973), demostrando así la hipótesis de Hebb. A este fenómeno se le conoce como potenciación a largo plazo. Desde este momento, numerosos estudios tratan de identificar las vías moleculares que explican los cambios neuronales y clarificar las bases para conocer los procesos subyacentes al aprendizaje y la memoria. Además de los cambios funcionales tras dichos procesos, se ha demostrado la existencia de cambios de tipo morfológico en estas neuronas que revelan la modificación de los circuitos cerebrales a través de la experiencia. Esta capacidad del SNC se conoce como plasticidad neuronal y es la base fisiológica sobre la que se apoya la capacidad de aprendizaje y, por lo tanto, la generación de nuevas memorias (Sweatt, 2016; von Bernhardi, Bernhardi, y Eugenio, 2017).

A través de varias décadas de investigación científica, se sabe que existen diferentes tipos de memoria en función del tiempo que transcurre entre la adquisición de la información y la recuperación de ésta, el recuerdo (Figura 6). El inicio de los modelos mnésicos tal y como los conocemos en la actualidad, se lo debemos a William James que, junto a Wilhelm Wundt, fundaron la psicología experimental. Su objetivo era aplicar los métodos científicos de la fisiología al estudio de la mente y, posteriormente, al cerebro y al sistema nervioso. Así, la filosofía dio lugar a la psicología y, una rama de ésta dio lugar a la psicología biológica o fisiológica, que más tarde se convirtió en neurociencia conductual (Clark, 2018). William James distinguió por primera vez en su tratado *Principios de psicología* entre

memoria primaria y secundaria (James, 1980), es decir, la actual **memoria a corto plazo y a largo plazo** respectivamente (Atkinson y Shiffrin, 1968). La memoria a corto plazo, conocida como **memoria de trabajo** (Baddeley, 1981) puede, por un lado, mantener una cantidad limitada de información en la mente  $-4 \pm 1$  elementos (Cowan, 2001)– durante un corto periodo de tiempo –segundos o minutos– sin que dicha información esté presente y, por otro lado, manipular esa información para utilizarla en otros procesos cognitivos superiores (Brem, Ran, y Pascual-Leone, 2013). Así, la memoria a corto plazo no se puede reducir a un sistema simple de almacenamiento pasivo, sino que interviene en la interpretación de la información para llevar a cabo tareas cognitivas complejas como el razonamiento, la toma de decisiones o la resolución de problemas (Norris, 2017). A través de diversos mecanismos, algunos contenidos de la memoria a corto plazo pueden almacenarse en la memoria a largo plazo de forma duradera. Este tipo de memoria permite almacenar una cantidad ilimitada de información durante largos periodos de tiempo –desde horas hasta años– mediante la consolidación del aprendizaje (Brem y cols., 2013). Tradicionalmente, la memoria a largo plazo se divide en dos tipos, la memoria implícita y la memoria explícita. En primer lugar, la **memoria implícita o no declarativa**, la cual almacena de forma inconsciente la información y engloba procesos como el i) **priming**, por el cual la exposición a determinados estímulos influye en la respuesta que se da a estímulos presentados con posterioridad y está relacionado con la neocorteza; ii) la **memoria procedimental**, que participa en el recuerdo de las habilidades motoras y ejecutivas necesarias para realizar una tarea e implica la activación del estriado; iii) el **aprendizaje asociativo**, que se refiere al condicionamiento clásico y operante y en el que participan el cerebelo y la amígdala; y iv) el **aprendizaje no asociativo**, que se refiere a la habituación y sensibilización, y depende de las vías reflejas (Kandel y cols., 2013). En segundo lugar, la **memoria explícita o declarativa**, almacena conscientemente la información sobre personas, lugares y objetos. Su adquisición se relaciona con el sistema hipocampal y su almacenamiento

se produce en diferentes áreas de la corteza cerebral (Brem y cols., 2013). La memoria explícita se divide a su vez en i) **memoria episódica**, es decir, acontecimientos acaecidos durante la vida de una persona sujeta a una referencia espaciotemporal, que se almacena en las zonas de asociación de los lóbulos frontales, y ii) **memoria semántica**, que hace referencia a los conocimientos adquirimos a lo largo de la vida y no está sujeta a una referencia espaciotemporal (Kandel y cols., 2013; Ferbinteanu, 2019).



**Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de memoria.** (Adaptada de: Atkinson y Shiffrin, 1968).

### 1.4.1. Aprendizaje y memoria espacial

La memoria tiene una larga historia de investigación en las ciencias del cerebro, donde la información espacial presenta un desafío particular para esta función cognitiva. Algunas características espaciales del entorno apenas varían con el tiempo mientras otras están en constante cambio. Los seres vivos debemos actualizar constantemente la representación del

entorno para determinadas tareas, como conocer la localización de un objeto o la planificación de rutas (Gibson y Mair, 2016).

El estudio neurobiológico moderno de la memoria espacial se remonta a principios de la década de 1970 con el descubrimiento por John O'Keefe y Dostrovsky de las células de lugar –*place cells*– en el hipocampo, las cuales responden cuando un animal se encuentra en un lugar particular de un entorno (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). La combinación de células que estaban activas en cada localización del entorno era única, lo que llevó a O'Keefe y Nadel (1978) a sugerir que el hipocampo es el lugar del mapa interno del cerebro del entorno espacial (O'Keefe y Nadel, 1978), una manifestación del mapa cognitivo propuesto a partir de experimentos puramente conductuales por Edward Tolman varias décadas antes (Tolman, 1948). Posteriormente, May-Britt Moser y Edvard Moser descubrieron células en el córtex entorrinal cuyas ubicaciones de disparo forman una cuadrícula triangular, proporcionando un sistema de coordenadas para un entorno determinado (Hafting y *cols.*, 2005). En estos estudios se demostró que los conjuntos de células de lugar representan no sólo la ubicación actual del animal, sino también las ubicaciones que el animal había visitado anteriormente (Moser y *cols.*, 2015).

La importancia de este conjunto de trabajos por sus descubrimientos de las células que constituyen el sistema de posicionamiento en el cerebro y sus estudios sobre la orientación en el espacio, fue reconocida con la concesión del Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2014 a O'Keefe, Moser y Moser (Gibson y Mair, 2016).

La función de las células de lugar en la memoria del hipocampo ya era evidente en los primeros estudios sobre dichas células. Las neuronas moduladas espacialmente se encuentran en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y se ha demostrado farmacológicamente que la codificación de la memoria espacial depende principalmente del receptor NMDA de Glu, mientras que la recuperación posterior de la información se relaciona con el receptor glutamatérgico AMPA (*ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolepropiónico*) (Rolls, 2018). Además, se ha visto que el

desplazamiento asimétrico depende de la activación de los receptores NMDA (Ekstrom y *cols.*, 2001), lo que concuerda con la sugerencia de que los mapas de lugar se refinan mediante la plasticidad sináptica a largo plazo dependiente de la experiencia (Mehta, Barnes, y McNaughton, 1997; Mehta, Quirk, y Wilson, 2000).

#### **1.4.2. Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial mediante modelos animales**

El estudio de la memoria espacial es un enfoque experimental clásico para investigar varias formas de memoria en roedores. El término memoria espacial se refiere a las propiedades espaciales del entorno y, es precisamente la capacidad de desplazarse de un lugar a otro –navegación– lo que se registra en las pruebas de memoria espacial en animales de experimentación (Morellini, 2013).

La forma en que navegan los roedores, generalmente se puede distinguir de una manera dicotómica, es decir, de un tipo de navegación aloécéntrica y egocéntrica (Piber y *cols.*, 2018). El tipo de navegación aloécéntrica presenta una estrategia centrada en el uso de claves contextuales obtenidas a través de los sentidos, y se ha descrito como dependiente del hipocampo (Grön y *cols.*, 2000; Moffat, Elkins, y Resnick, 2006). Sin embargo, el tipo de navegación egocéntrica se ha descrito como dependiente del lóbulo parietal y presenta una estrategia centrada en el uso de señales internas, como distancias y direcciones hacia o desde puntos de referencia individuales, así como la percepción de los propios movimientos corporales (Maguire y *cols.*, 1998).

El tipo de memoria que se evalúa dependerá del laberinto y protocolo empleados. Para el estudio de la memoria espacial, son comunes los laberintos que utilizan claves contextuales distribuidas por las paredes de la sala de experimentación (Morellini, 2013). Se realizan tareas en las que los animales deben encontrar reforzadores positivos, como alimento, agua, novedad por entorno, etc., y gracias a las claves viso-espaciales, los

animales son capaces de aprender y recordar los lugares donde pueden encontrarlos. Otras tareas se basan en evitar reforzadores negativos, como luces y sonidos intensos o la inmersión en el agua. Los paradigmas más utilizados para estudiar el aprendizaje y memoria espacial en roedores son:

- I. El **laberinto en Y o en T** se utiliza para evaluar la memoria de trabajo espacial en roedores a través del análisis de la alternancia espontánea. Ésta se evalúa mediante la exploración libre de los tres brazos del laberinto y, es impulsada por una curiosidad innata de los roedores para explorar áreas previamente no visitadas (Kraeuter, Guest, y Sarnyai, 2019). La evaluación de la memoria de trabajo se realiza mediante el cálculo del ratio o porcentaje de alternancias correctas frente a las totales. Este paradigma presenta simplicidad, rapidez y disminución del estrés, lo cual aporta ventajas frente a otros laberintos. Sin embargo, no permite evaluar la curva de aprendizaje (Morellini, 2013). Este ensayo está diseñado para detectar deterioro en la memoria espacial más que una mejora de los niveles basales, por este motivo, la realización de la tarea en el laberinto en Y por animales sanos no es susceptible de mejoras (Ricciarelli y cols., 2017).
- II. El **laberinto radial de ocho brazos (RAM;** del inglés *Radial arm maze*) se emplea para la evaluación de la memoria de trabajo espacial y de la memoria de referencia (Olton, David, y Samuelson, 1976), además de la curva de aprendizaje realizando varias sesiones en días consecutivos. En su forma más simple, se coloca comida a modo de reforzador natural en todos los brazos del laberinto y se introduce al animal para que la localice. En otros protocolos se colocan los reforzadores solo en algunos brazos y se utilizan claves contextuales para que los animales las asocien con los brazos que tienen alimento (Olton y Papas, 1979). Los errores cometidos por el animal son los que permiten la evaluación de la memoria, pudiendo ser estos errores de memoria de trabajo

(la entrada en un brazo que ya ha sido visitado previamente durante la misma sesión) o de referencia (la entrada a un brazo en el que nunca se había puesto reforzador). La capacidad de evaluar diferentes tipos de memoria y el aprendizaje simultáneamente concede a este paradigma una ventaja frente a otros (Morellini, 2013). Sin embargo, presenta un inconveniente, pues el RAM precisa de la privación de comida a los animales para mantenerlos a un 90% de su peso normal, con el fin de aumentar su motivación por la búsqueda de comida, incrementando su nivel de estrés (Hodges, 1996).

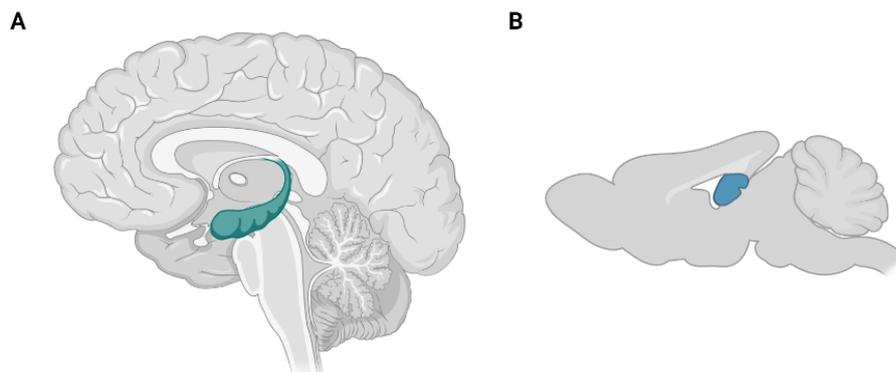
- III. **El laberinto acuático de Morris (MWM;** del inglés *Morris water maze*) es un paradigma que evalúa el aprendizaje y la memoria de referencia tanto a corto como a largo plazo midiendo el tiempo de latencia en encontrar una plataforma sumergida en una piscina circular llena de agua opaca. La principal ventaja de este protocolo es que el aprendizaje es más rápido que en el RAM, debido a la estimulación aversiva (sumergir al animal en el agua) y, además, no requiere de la privación de comida (Hodges, 1996). Sin embargo, la realización de la tarea en el MWM se ve afectada por el elevado nivel de estrés producido por el agua, lo que podría afectar a los resultados obtenidos (Morellini, 2013).
  
- IV. **La tarea de reconocimiento de un lugar nuevo (NLR;** del inglés *Novel location recognition test*) evalúa la memoria espacial de referencia midiendo el tanto el tiempo como el número de contactos con un objeto que ha sido cambiado de lugar. Este paradigma presenta las ventajas de la rapidez y sencillez, lo cual reduce el nivel de estrés del animal que se somete a la tarea. No obstante, este paradigma no evalúa memoria de trabajo ni aprendizaje (Morellini, 2013).

En la presente Tesis Doctoral, se ha utilizado el Laberinto en Y ya que ofrece una medida rápida y sencilla de la memoria de trabajo espacial (Morellini, 2013). Además, se considera que la influencia de variables como el estrés es mínima, debido a que se basa en la tendencia natural de los roedores por la exploración. Sin embargo, a pesar de su sencillez, se ha demostrado que este tipo de tareas sin reforzamiento son muy sensibles a la hora de detectar alteraciones hipocampales (Rudy, 2009).

### 1.5. El hipocampo

La memoria es uno de los procesos cognitivos más importantes de nuestro cerebro. Desde el trabajo de Scoville y Milner (1957) sobre el paciente H.M., muchos estudios han proporcionado evidencia de que el lóbulo temporal medial, especialmente el **hipocampo**, es necesario para cierto tipo de memoria, como los recuerdos de experiencias diarias (memoria episódica) y la historia personal (memoria autobiográfica) (Takehara-Nishiuchi, 2014).

El hipocampo es una estructura cerebral ubicada en la región medial del lóbulo temporal de ambos hemisferios que, debido a su localización, pertenece tanto a al sistema límbico como a la arquicorteza (Figura 7).



**Figura 7. Localización del hipocampo** en un corte sagital del cerebro humano (en verde) (A) y de roedor (en azul) (B) (figura realizada mediante la web Biorender).

La primera descripción del hipocampo fue escrita por el anatomista Giulio Cesare Aranzi (*Julius Caesar Arantius*, 1587), quien dio el nombre a esta pequeña parte del cerebro (–hipocampo–, del latín “caballo monstruo marino”) (Bir y cols., 2015). Desde entonces han surgido diferentes líneas teóricas sobre el hipocampo y sus funciones en el cerebro. En primer lugar, la teoría sobre la inhibición de la conducta, basada en la observación de la hiperactividad y la dificultad en la inhibición de respuestas que producía a los animales una lesión en el hipocampo (Nadel, O'Keefe, y Black, 1975). Estos mismos autores, desarrollaron otra línea teórica que relacionaba el hipocampo con la regulación de la percepción espacial, es decir, la localización con respecto al entorno gracias al descubrimiento de las células de lugar en 1971 (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Por último, en 1953, se empezó a relacionar y entender la importancia del hipocampo en la memoria. El trabajo de Scoville y Milner, describe los resultados de la extirpación quirúrgica del hipocampo, con el fin de aliviar los graves ataques epilépticos de su paciente H.M. Esta intervención resultó en una amnesia anterógrada grave y una amnesia retrógrada parcial, convirtiendo al paciente H.M. en el sujeto más estudiado en la historia médica (Scoville y Milner, 1957). Actualmente existe un acuerdo prácticamente universal en el que el hipocampo desempeña un papel importante tanto en la memoria como en la codificación espacial.

### **1.5.1. Estructura y conexiones del hipocampo**

El hipocampo es parte de una estructura mucho mayor denominada formación hipocampal, constituida adicionalmente por el giro dentado (GD), el subículo (SUB), la corteza entorrinal (CE) y el hipocampo propiamente dicho (Figura 8A).

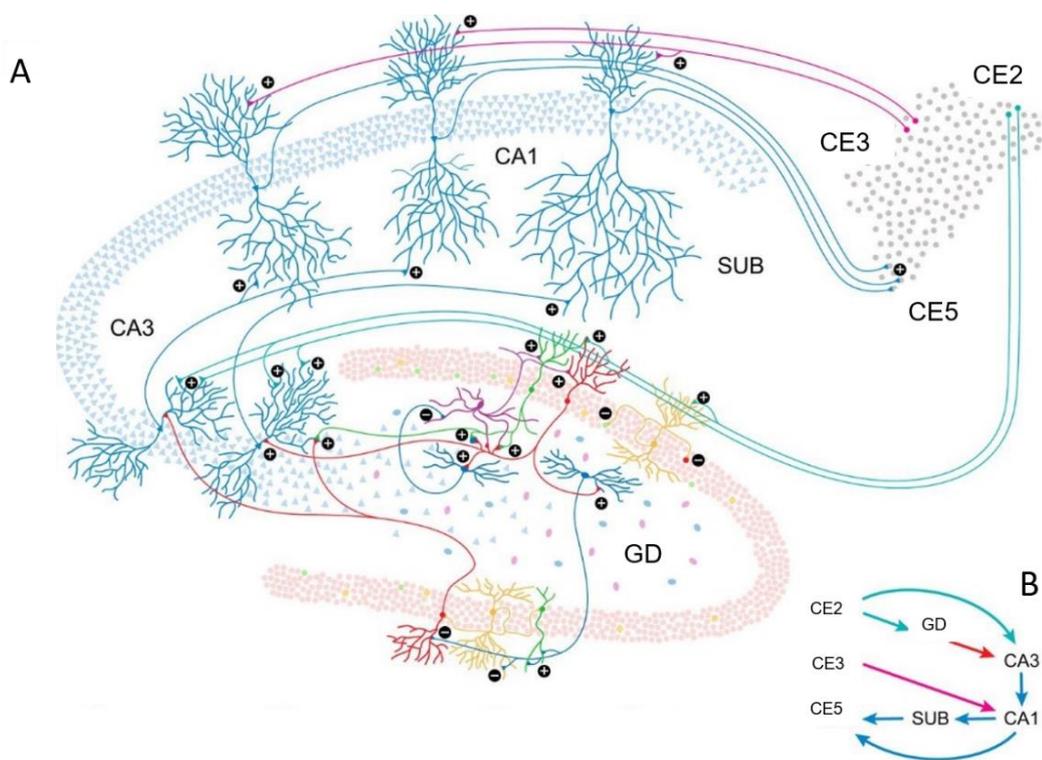
La CE es una de las regiones corticales que rodean el hipocampo. Está dividida en cinco capas y se ha descrito como un centro de la red de memoria cortical debido a sus conexiones recíprocas con el hipocampo y con las regiones neocorticales. Los axones de las células piramidales de la

capa II proyectan hacia el GD, mientras que de la capa V, la más profunda, salen eferencias a otras áreas cerebrales y recibe aferencias del SUB. Por otro lado, el GD se divide en tres capas de células granulares, las cuales proyectan sus axones hacia las células piramidales del área CA3 del hipocampo (Schultz y Engelhardt, 2014; Takehara-Nishiuchi, 2014).

Desde el punto de vista citoarquitectónico e histológico, el término hipocampo hace referencia a una región de la formación hipocampal que implica los campos denominados con la abreviación CA (*cornu Ammonis* o asta de Ammon) y se dividen en CA1, CA2 y CA3, cada uno de ellos formado por una capa de **neuronas piramidales**. Dicha subdivisión tiene implicaciones tanto anatómicas como funcionales, ya que cada una de estas regiones tiene conexiones y propiedades neuronales diferentes. Algunos autores reconocen una cuarta región denominada CA4; sin embargo, es considerada desde hace varios años como una capa profunda del GD. El hipocampo es una estructura con una organización laminar en la cual se pueden observar varios estratos o capas. En la región *stratum oriens* (dendritas basales de las células piramidales) y *stratum radiatum* (dendritas apicales de las células piramidales), discurren varias interconexiones entre CA3 y la **vía colateral de Schaffer**, la cual conecta CA3 con CA1. En la región CA3, se encuentra una zona denominada *stratum lucidum* (axones de las células piramidales de CA3) en la cual las fibras musgosas provenientes del GD generan dos tipos de sinapsis altamente especializadas: una para células piramidales y otra para interneuronas gabaérgicas. Por último, la capa más superficial del hipocampo es el denominado *stratum lacunosum-moleculare* (botones terminales de las dendritas apicales) donde se encuentran las terminaciones de la CE (Knierim, 2015; Preston-Ferrer y Burgalossi, 2018).

Las aferencias procedentes de las distintas áreas cerebrales llegan a la CE y al GD, desde donde son enviadas al hipocampo siguiendo una organización laminar y unidireccional por tres vías (Figura 8B). De esta manera, las células piramidales de la CE proyectan sus axones sobre las células granulares del GD por medio de denominada vía perforante.

Posteriormente, las células granulares proyectan por medio de la vía de las fibras musgosas hacia las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 y, las neuronas de CA3, proyectan a CA1 por medio de la vía colateral de *Schaffer*. Finalmente, una vez integrada la información en CA1, las neuronas piramidales de ésta completan el circuito enviando eferencias al SUB, y de allí nuevamente a la CE. En cada una de las sinapsis que implica el este circuito se ha logrado inducir potenciación a largo plazo, sin embargo, es la colateral de *Schaffer* la vía más utilizada para el estudio de la plasticidad sináptica hipocámpal debido a sus características plásticas, planteando que sus conexiones participan activamente en la adquisición y mantenimiento de la memoria espacial (Schultz y Engelhardt, 2014; Danielson y cols., 2016; Park y cols., 2018).

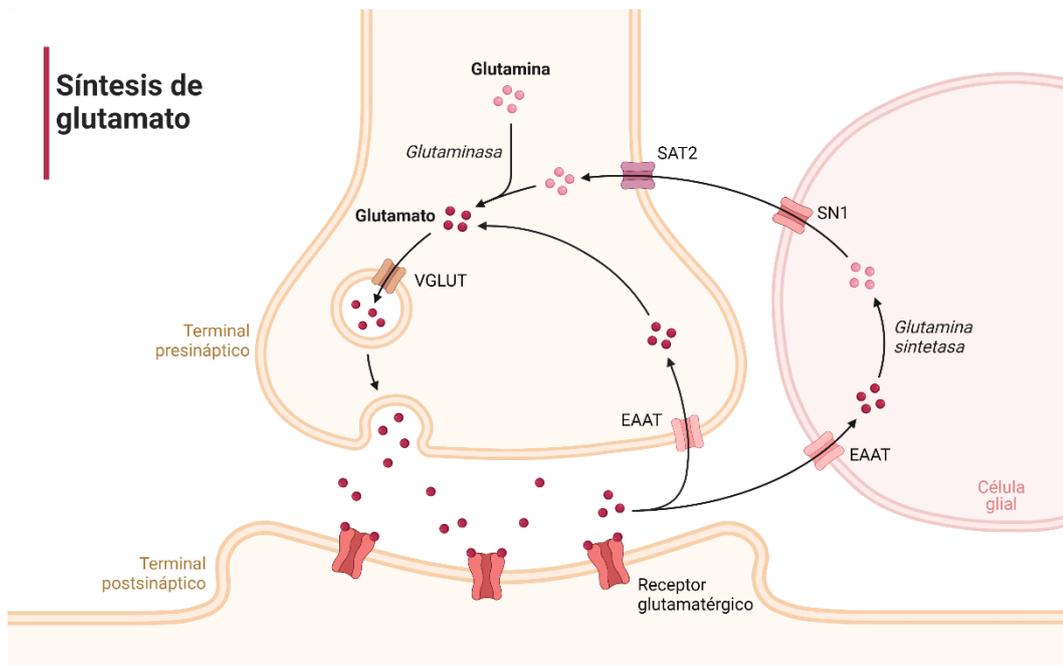


**Figura 8. Esquema de las áreas que forman el sistema hipocámpal (A) y sus conexiones internas (B).** CA1 y CA3: Zonas del hipocampo; CE: Corteza entorrinal; GD: Giro dentado; SUB: Subículo (figura extraída de Aimone y cols., 2014).

### 1.5.2. Transmisión hipocampal

El Glu es el principal neurotransmisor excitador del cerebro en general y del hipocampo en particular, así, las neuronas glutamatérgicas representan la clase neuronal más grande del cerebro y son responsables de la mayor parte de la transmisión sináptica excitadora y la plasticidad (Chang y cols., 2019).

El Glu está ampliamente distribuido por el SNC y se produce en las neuronas y en las células gliales a partir de glucosa. Una vez sintetizado, se almacena en las vesículas y, durante la neurotransmisión glutamatérgica, se libera en la hendidura sináptica, donde se une a los receptores de Glu que se encuentran en las neuronas postsinápticas. En condiciones fisiológicas, su concentración intracelular oscila entre 1 y 10 mM; sin embargo, extracelularmente se mantiene por debajo de 2  $\mu$ M para evitar la excitotoxicidad que produce la acumulación excesiva de este neurotransmisor. Esto es posible gracias a la recaptación de Glu por parte de las neuronas y los astrocitos a través de sus transportadores (EAAT1/2). En las células gliales, el Glu se convierte en Gln en presencia de la glutamina sintetasa. Las neuronas presinápticas recuperan la Gln y la convierten en Glu por la acción de la glutaminasa. El Glu es transportado a las vesículas sinápticas mediante la actividad de los transportadores vesiculares de Glu 1 y 2 (VGLUT1/2), donde se almacena comenzando de nuevo el ciclo (Meldrum, 2000; Chang y cols., 2019) (Figura 9).



**Figura 9. Síntesis de glutamato y ciclo glutamato/glutamina.** Balance metabólico y el reciclaje de aminoácidos para el normal funcionamiento del cerebro. El ciclo Glu/Gln es un mecanismo de protección contra la excitotoxicidad mediada por Glu en condiciones fisiológicas (figura realizada utilizando la web Biorender).

El Glu se une a sus receptores que se encuentran en las neuronas postsinápticas y se dividen en dos tipos: ionotrópicos y metabotrópicos. Los **receptores ionotrópicos** se asocian a canales iónicos que permiten el flujo de cationes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ ). El Glu actúa postsinápticamente en tres familias de receptores ionotrópicos, denominados NMDA, AMPA y kainato. Los **receptores metabotrópicos** de Glu son receptores acoplados a proteínas G, y provocan cambios duraderos en neuronas y células gliales. Hasta el momento se han descrito ocho subtipos (mGluR1-mGluR8) (Monyer y cols., 1992; Sanz-Clemente, Nicoll, y Roche, 2013; Kamalova y Nakagawa, 2021).

La presente Tesis Doctoral se centra en los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA, debido a su papel tanto en la transmisión sináptica excitadora como en los procesos de plasticidad sináptica hipocampal (Meldrum, 2000).

### 1.5.2.1. Receptores glutamatergicos NMDA y AMPA

El aprendizaje y la memoria, así como la plasticidad sináptica que se considera su correlato electrofisiológico, dependen de la transmisión glutamatergica (Niciu, Kelmendi, y Sanacora, 2012). Los receptores ionotrópicos de Glu AMPA y NMDA son cruciales en los cambios sinápticos dependientes de la actividad (Baez, Cercato, y Jerusalinsky, 2018).

El receptor NMDA es una proteína transmembranal con propiedades particulares, que le permiten intervenir activamente en los procesos de modificación sináptica (Vyklícky y cols., 2014). Los receptores NMDA son canales iónicos regulados por ligando, permeables al Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, compuestos por dos subunidades GluN1 de unión a glicina y dos subunidades GluN2/3 de unión a Glu (GluN2 A-D, GluN3 A-B) que dan lugar a canales iónicos di- o tri-heterotetraméricos para formar el receptor (Monyer y cols., 1992; Strehlow y cols., 2019) y que definen su perfil farmacológico y fisiológico (Baez y cols., 2018).

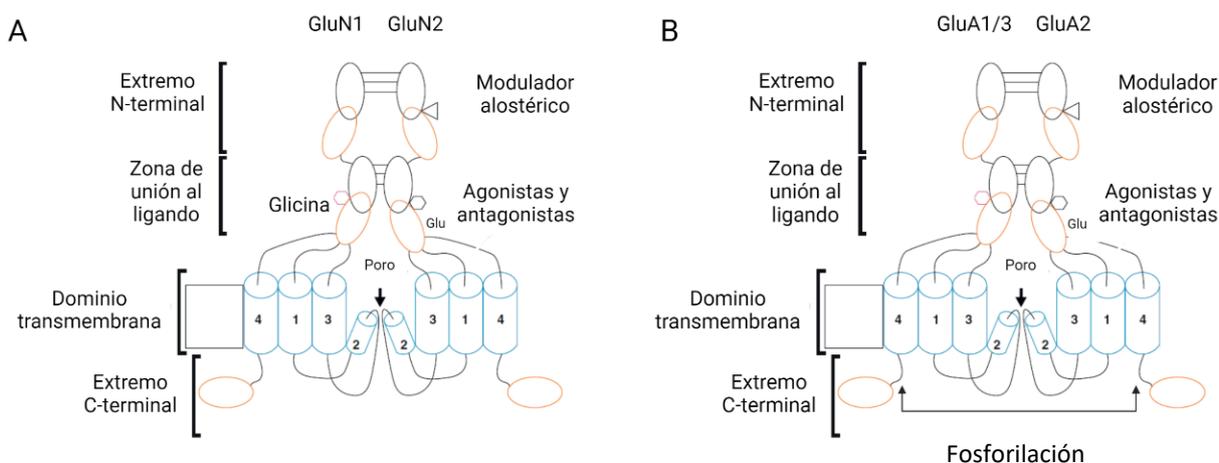
Todas las subunidades tienen un nivel significativo de homología y están muy relacionadas en su estructura, con una organización de dominios conservada. Presentan un dominio N-terminal extracelular, donde se unen los moduladores alostéricos, unido a un dominio de unión al ligando endógeno, al que se unen los agonistas o antagonistas. El dominio extracelular está conectado a un dominio transmembrana, formado por cuatro hélices transmembrana hidrofóbicas, que forman el canal iónico, y que a su vez se comunican con un dominio intracelular C-terminal (Flores-Soto y cols., 2012; Vyklícky y cols., 2014) (Figura 10A).

En las estructuras del SNC implicadas en funciones cognitivas, como el hipocampo y la corteza prefrontal, GluN2A y GluN2B son las principales subunidades reguladoras (Paoletti, Bellone, y Zhou, 2013; Sanz-Clemente y cols., 2013), mientras que GluN1 se expresa de forma ubicua en el SNC, y GluN2C y GluN2D se localizan en el cerebelo y diencefalo (Niciu y cols., 2012).

En el cerebro de los mamíferos, la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria rápida la llevan a cabo los receptores de Glu

ionotrópicos AMPA, situados en la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas (Traynelis y cols., 2010). Los receptores AMPA abren canales de cationes en respuesta a la unión del Glu, despolarizando así las membranas postsinápticas. El complejo de señalización de los receptores AMPA se compone típicamente de receptores AMPA tetraméricos y de una amplia gama de proteínas auxiliares, las cuales modulan el tráfico, la compuerta, la farmacología y la permeabilidad de los receptores, lo que conduce a un ajuste espacial y temporal de la función de los receptores AMPA que, a su vez, es fundamental para la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Jackson y Nicoll, 2011; Haering y cols., 2014).

Las subunidades formadoras de poros de los receptores AMPA, conocidas como GluA1-4 (Collingridge y cols., 2009; Greger, Watson, y Cull-Candy, 2017), constan de cuatro dominios (Figura 10B). El dominio N-terminal, el más alejado de la membrana y situado en el espacio extracelular, está conectado con el dominio de unión a ligando. Tras la unión del Glu, el dominio de unión a ligando experimenta cambios conformacionales que dan lugar a la activación del canal. A su vez, éste se conecta al dominio transmembrana, que consta de tres segmentos que abarcan la membrana (M1, M3 y M4) y un bucle helicoidal reentrante (M2). El dominio transmembrana forma un canal de iones en la membrana que cuando está abierto conduce cationes. Por último, hay un dominio citoplasmático C-terminal que regula el anclaje, la señalización y el tráfico (Kamalova y Nakagawa, 2021).



**Figura 10. Receptores NMDA y AMPA glutamatergicos.** Representación esquemática de la estructura del receptor NMDA (A) y AMPA (B) de Glu y sus sitios de unión (figura realizada utilizando la web Biorender y adaptada de Flores-Soto y cols., 2012; Greger y cols., 2012).

Mientras que los receptores AMPA son capaces de mediar la neurotransmisión ordinaria de Glu, el canal NMDA suele ser bloqueado por el  $Mg^{2+}$  extracelular en los potenciales de reposo de la membrana celular. Para lograr una transmisión efectiva a través de los receptores NMDA, éstos deben ser desbloqueados por la despolarización de la membrana a través de la activación de los receptores AMPA, mientras que, al mismo tiempo, tanto el Glu como la glicina deben unirse al receptor (Baez y cols., 2018). Por lo tanto, los receptores glutamatergicos NMDA y AMPA son fundamentales en los procesos de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo.

### 1.5.3. Plasticidad sináptica hipocampal

Las conexiones sinápticas entre las neuronas proporcionan el “cableado” básico del circuito encefálico. La conectividad sináptica entre las neuronas es una entidad dinámica que está en constante cambio en respuesta a la actividad neural. Estos cambios en la transmisión sináptica surgen de la plasticidad sináptica, modificando la eficacia y la fuerza de las sinapsis en respuesta a un aumento o disminución en su actividad (Citri y Malenka, 2008). De este fenómeno depende la memoria, el aprendizaje y

las modificaciones del comportamiento para adaptarse a un medio ambiente cambiante (Neves, Cooke, y Bliss, 2008). Los cambios en la fuerza sináptica se estudian mediante registros electrofisiológicos, y se ha demostrado la existencia de varias formas de plasticidad sináptica, entre las que destacan la **potenciación a largo plazo (LTP)**, cuando algunos patrones de actividad sináptica producen un aumento duradero de la fuerza sináptica (Bliss y Collingridge, 1993), y la **depresión a largo plazo (LTD;** del inglés *long-term depression*), cuando los patrones de actividad producen una disminución de la fuerza sináptica (Collingridge y cols., 2010). Estos mecanismos plásticos son considerados la base celular subyacente a los procesos de aprendizaje y memoria.

#### **1.5.3.1. Potenciación a largo plazo**

La plasticidad sináptica a largo plazo ha sido muy estudiada en las sinapsis excitatorias del hipocampo, área especialmente importante en la formación y recuperación de algunas formas de memoria (Neves y cols., 2008).

La investigación sobre potenciación a largo plazo comenzó a finales de 1960, cuando Terje Lømo y Timothy Bliss descubrieron que algunos segundos de estimulación eléctrica de alta frecuencia podían aumentar la transmisión sináptica en el hipocampo del conejo durante días o incluso semanas. Así, aquellas sinapsis inicialmente débiles modifican su arquitectura después de ser sometidas a estímulos de alta frecuencia, de tal forma que en las etapas subsiguientes transmiten los impulsos nerviosos de una forma más intensa. Dicho fenómeno ha recibido el nombre de potenciación a largo plazo –LTP– (Bliss y Lømo, 1973). La duración prolongada de la potenciación muestra que esta forma de plasticidad sináptica es capaz de servir como mecanismo para el almacenamiento prolongado de información (Bliss y Collingridge, 1993).

La LTP se ha definido en muchas sinapsis diferentes del cerebro y puede manifestarse de muchas formas distintas en diferentes sinapsis.

Además, incluso en la misma sinapsis pueden revelarse diferentes formas de LTP. Por ejemplo, en las sinapsis entre las células granulares del GD y las neuronas piramidales de CA3, la LTP es presináptica e implica la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje y la señalización de AMPc (adenosín monofosfato cíclico)-PKA (proteína quinasa A) (Nicoll y Schmitz, 2005). La LTP en las sinapsis de la vía colateral de *Schaffer* y las neuronas piramidales de CA1 depende de los receptores NMDA, y se produce fundamentalmente por modificaciones postsinápticas (Grover y Teyler, 1990; Wang y cols., 2016). Gran parte de los estudios sobre LTP se centran en la LTP dependiente de los receptores NMDA, porque esta forma de LTP es un modelo adecuado para el aprendizaje asociativo y es esta forma específica de LTP en la que se centra la presente Tesis Doctoral.

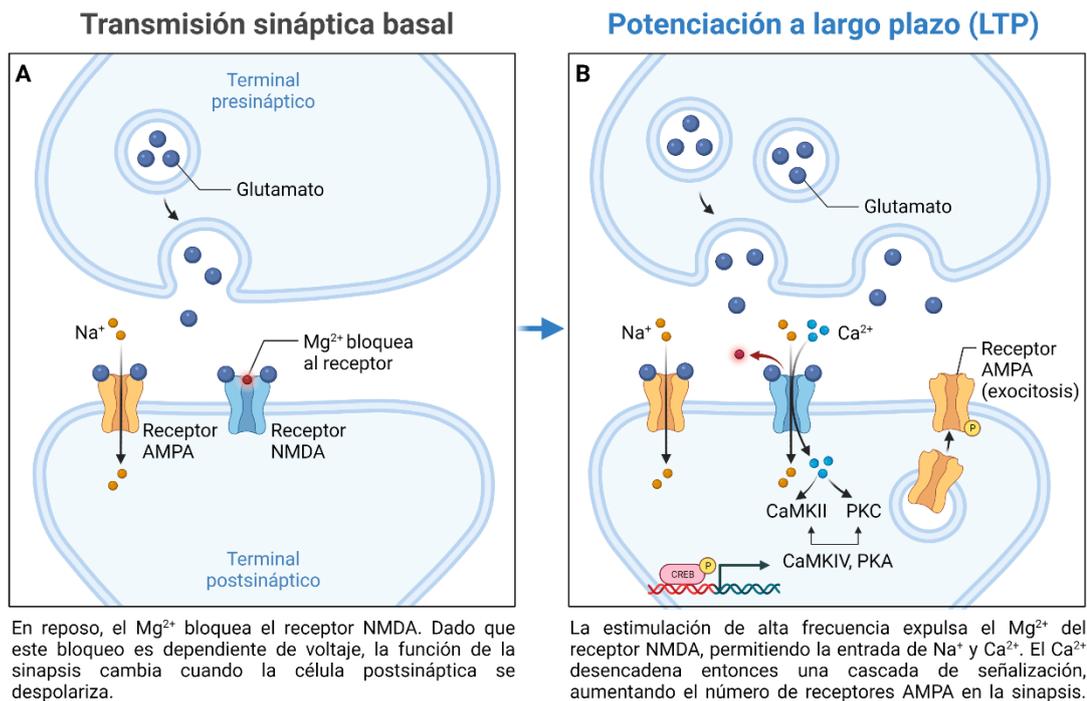
La LTP consta de dos fases, una primera **fase temprana** que es independiente de la síntesis de proteínas (**e-LTP**; del inglés *early-LTP*), y una segunda **fase tardía** (**I-LTP**; del inglés *late-LTP*) que implica la activación de factores de transcripción y depende de la síntesis de proteínas y de cambios estructurales. Un solo tren de estimulación de alta frecuencia (HFS; del inglés *high frequency stimulation*) conduce a la e-LTP que dura 1-3 horas. Las aplicaciones intermitentes y repetitivas de HFS producen I-LTP que dura hasta incluso 24 horas, debido a la síntesis de nuevas proteínas en la célula postsináptica (Frey, Huang, y Kandel, 1993; Abel y cols., 1997; Kandel, 2001).

Los primeros estudios revelaron que las características de la LTP coinciden con las reglas del aprendizaje *Hebbiano* (Hebb, 1949). Mientras que los estímulos excitatorios débiles no pueden producir LTP, la estimulación simultánea de múltiples axones aferentes puede superar el umbral requerido para la LTP (cooperatividad). Además, cuando un estímulo que es demasiado débil para inducir LTP por sí solo se presenta con un estímulo fuerte, consigue producir LTP (asociatividad). Otra propiedad clave de la LTP es su especificidad de entrada, la cual define

que la LTP solo está relacionada con las aferencias que reciben el HFS (McNaughton, Douglas, y Goddard, 1978; Levy y Steward, 1979).

### **1.5.3.2. Mecanismos moleculares implicados en la plasticidad sináptica**

Las propiedades de la LTP descritas anteriormente derivan de las características específicas del receptor NMDA, que es clave en los procesos de LTP y tiene como ligando natural al neurotransmisor Glu. En reposo, el receptor NMDA permanece bloqueado por un ion  $Mg^{2+}$  (Figura 11A). Para ser abierto requiere de dos fenómenos simultáneos: la despolarización de la membrana celular, que desplaza el  $Mg^{2+}$ , y la entrada de una molécula de Glu procedente del espacio sináptico (Kandel y *cols.*, 2013). Dado que el bloqueo es dependiente de voltaje, la función de la sinapsis cambia cuando la célula postsináptica se despolariza. Por lo tanto, la estimulación de alta frecuencia produce una despolarización prolongada que expulsa al  $Mg^{2+}$ . La eliminación del  $Mg^{2+}$ , abre canales iónicos a través del receptor NMDA, por los cuales ingresan en la célula iones de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  a la neurona postsináptica (Lüscher y Malenka, 2012). El flujo de  $Ca^{2+}$  es fundamental para la inducción de la LTP y actúa como segundo mensajero activando cascadas complejas de transducción de señales, que incluyen diversas enzimas, como la proteína quinasa calcio/calmodulina dependiente (CaMKII) y la proteína quinasa C (PKC), e induciendo la primera fase de la LTP (*e*-LTP) (Lisman, Yasuda, y Raghavachari, 2012; Sacktor y Fenton, 2018). Como resultado, se fosforilan otras proteínas, como el receptor AMPA. En su forma fosforilada, este receptor se transloca a la membrana, aumentando así la sensibilidad a Glu. En estas condiciones se activan quinasas como PKA y CAMKIV, que estimulan la actividad de varios factores de transcripción, entre ellos CREB, que induce la síntesis de proteínas destinadas a la creación de nuevas sinapsis, dando lugar a la segunda fase de la LTP (*i*-LTP) (Herring y Nicoll, 2016; Leal, Bramham, y Duarte, 2017; Baltaci y *cols.*, 2019) (Figura 11B).



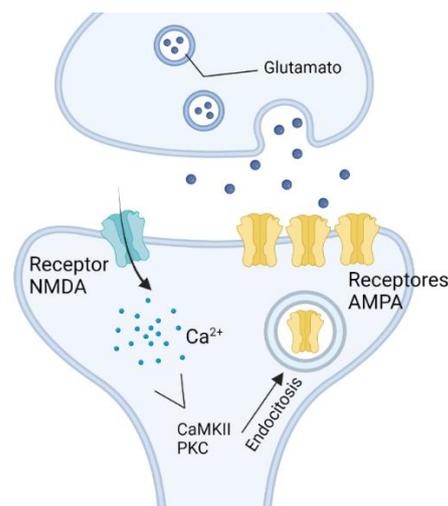
**Figura 11. Potenciación a largo plazo.** Representación de la liberación presináptica de Glu durante la transmisión sináptica basal (A) y cascada de señalización tras la inducción de la LTP mediante HFS (B) (figura realizada utilizando la web Biorender).

Existen otras vías de señalización implicadas en la LTP. Por un lado, la activación de MAPK mediante PKA en las sinapsis colaterales de Schaffer, que requiere la translocación nuclear de MAPK e implica la transcripción de genes implicados en la consolidación de la memoria (Huang y Kandel, 1994; Bozon y cols., 2003). Por otro lado, BDNF se encuentra tanto en las regiones presinápticas como postsinápticas en las sinapsis glutamatérgicas (Lessmann y Brigadski, 2009; Dieni y cols., 2012) y se libera en respuesta a los estímulos inductores de LTP (Hartmann y cols., 2001). El BDNF presináptico está involucrado en la inducción de la LTP, mientras que el BDNF postsináptico contribuye al mantenimiento de LTP, por lo que se considera a este factor un importante regulador de la plasticidad sináptica y la síntesis de proteínas durante la LTP (Park y Poo, 2013).

La LTD (Figura 12) es la disminución duradera de la eficacia y la fuerza sináptica. Si bien la LTP requiere una estimulación breve de alta frecuencia, a finales de 1970 se encontró que una estimulación de baja

frecuencia (LFS; del inglés *low frequency stimulation*) durante períodos prolongados, daba lugar a una debilitación en la sinapsis (Collingridge y *cols.*, 2010).

Del mismo modo que la LTP, para que se dé LTD es necesaria la activación del receptor NMDA glutamatérgico y el ingreso resultante de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula postsináptica. Sin embargo, en este caso, son las elevaciones pequeñas y lentas de  $\text{Ca}^{2+}$  las que conducen a la depresión (Lüscher y Malenka, 2012). Estas cantidades moderadas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular favorecen la activación de fosfatasa calcio-dependientes, que se asocia con la endocitosis de receptores AMPA en la célula postsináptica, (Kessels y Malinow, 2009). Por otro lado, la desfosforilación de CREB conduce a cambios de expresión génica y síntesis de proteínas, reduciendo el número y tamaño de las sinapsis y provocando la larga duración del fenómeno (Collingridge y *cols.*, 2010; Sala y Segal, 2014). Por tanto, puesto que los receptores NMDA están fuertemente implicados en el desarrollo sináptico (Medina y *cols.*, 2001) y en la modulación de patrones de actividad tales como la LTP o LTD, son considerados los sustratos fisiológicos que explican, a nivel celular y molecular, los procesos de aprendizaje y memoria (Hayashi y *cols.*, 2000; Clayton y *cols.*, 2002; Grosshans y *cols.*, 2002).



**Figura 12. Depresión a largo plazo.** Receptores AMPA y NMDA activados por la liberación presináptica de Glu y cascada de señalización que provoca una LFE (figura realizada utilizando la web Biorender).

Al igual que los receptores NMDA, los receptores AMPA son también esenciales para la inducción y mantenimiento de la LTP y de la LTD (Hayashi y cols., 2000; Clayton y cols., 2002; Grosshans y cols., 2002; Malinow y Malenka, 2002; Lee y Kirkwood, 2011). Numerosos estudios de electrofisiología demuestran que la densidad de receptores AMPA postsinápticos es un factor determinante para la eficacia de la transmisión sináptica (Luscher y cols., 1999; Malenka y Nicoll, 1999; Malinow y Malenka, 2002). En consecuencia, la densidad de proteínas de ambos receptores glutamatérgicos en el hipocampo se asocia con la regulación de la plasticidad sináptica hipocampal (Adams y cols., 2001; Clayton y cols., 2002).

Sin embargo, no solo estos receptores están involucrados en la inducción de la LTP; los receptores metabotrópicos de Glu (mGluR) también presentan un papel muy relevante en la regulación de la transmisión sináptica, en procesos de desarrollo cerebral y en eventos de plasticidad neuronal, concretamente, los mGlu del grupo I, tanto el receptor mGluR1 como mGluR5 (Hermans y Challiss, 2001). La estimulación de estos receptores produce una pérdida de receptores NMDA y AMPA en las sinapsis (Snyder y cols., 2001), promueve la endocitosis del receptor AMPA (Chowdhury y Hell., 2019) e induce LTD (Bolshakov y Siegelbaum, 1994). Esta LTD inducida por receptores mGlu del grupo I requiere de la síntesis *de novo* de proteínas y de la activación de la vía de señalización intracelular PI3K/Akt/mTOR (Huber, Kayser, y Bear, 2000; Hou y Klann, 2004). Por otro lado, se ha establecido firmemente que la LTP dependiente de receptores mGlu se produce en muchas sinapsis excitatorias del cerebro (Anwyl, 2009). La LTP mediada por receptores AMPA ha sido bien establecida como dependiente de mGluR1 en las interneuronas del hipocampo, mientras que la LTP mediada por receptores NMDA ha sido bien establecida como dependiente de mGluR5 (Neyman y Manahan-Vaughan, 2008). Curiosamente, mientras el primer caso se expresa presinápticamente, el segundo se expresa postsinápticamente (Anwyl, 2009). Las vías de señalización intracelular no se han investigado en

detalle, sin embargo, la inducción de la LTP dependiente de mGluR en la mayoría de las sinapsis requiere un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de PKC (O'Connor, Rowan, y Anwyl, 1995; Kwon y Castillo, 2008).

Debemos considerar que la LTP requiere una mayor actividad sináptica glutamatérgica, lo que desencadena una mayor demanda energética. Sin embargo, los mecanismos por los que los sensores de energía pueden modular las vías de señalización de la LTP todavía deben esclarecerse. En este sentido, la **proteína quinasa activada por AMP (AMPK)**, que es un sensor energía celular, y que presenta intercomunicación con otras vías de señalización, puede suponer un factor relevante en el establecimiento de este proceso sináptico. Una vez activada la AMPK, desencadena una serie de eventos para aumentar el suministro de ATP celular y suprime las vías anabólicas que consumen ATP (Rashtiani y cols., 2021). Estudios recientes han demostrado un aumento de la expresión de AMPK en el hipocampo en modelos de deterioro inducido por escopolamina, lo que sugiere un papel relevante de ésta en el aprendizaje y la memoria (Kim y cols., 2013).

## **1.6. Tributirina, memoria espacial y plasticidad sináptica en el hipocampo**

En la actualidad, las enfermedades relacionadas con la obesidad se han convertido en uno de los principales problemas de salud. Además de producir problemas metabólicos y enfermedades cardiovasculares, numerosos estudios asocian la obesidad con cambios en el cerebro de carácter estructural, deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas (Arnoldussen y cols., 2017). Una de las razones por las que se explica esta pandemia es la ingesta de dietas ricas en grasa y de alimentos de elevada palatabilidad.

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que las dietas con un alto contenido en grasas saturadas (HF;

del inglés *high fat*) inducen un deterioro permanente de la memoria espacial dependiente del hipocampo cuando se administran a animales jóvenes (Valladolid-Acebes y cols., 2011). A su vez, este tipo de dietas provocan importantes cambios morfológicos en las neuronas del hipocampo, así como alteraciones en la modulación de la transmisión glutamatérgica (Valladolid-Acebes y cols., 2012; 2013), y de los procesos plásticos que subyacen al aprendizaje y la memoria dependientes de esta área cerebral (Fernández-Felipe y cols., 2021).

Las dietas HF presentan en su composición una gran proporción de grasa saturada que podría ser responsable de su efecto deletéreo sobre el aprendizaje y la memoria (Valladolid-Acebes y cols., 2011). En general, se considera que los ácidos grasos saturados de cadena larga son los responsables de este daño; por el contrario, los AGCC están cobrando un creciente interés debido a sus posibles efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas (Govindarajan y cols., 2011; Lei y cols., 2016; Fernando y cols., 2020). En este sentido, resultados recientes han puesto de manifiesto que el tratamiento con una dieta rica en AB mejoraba la memoria en ratones con deterioro cognitivo inducido por dietas HF (Arnoldussen y cols., 2017).

Sabemos que el incremento de la acetilación de histonas inducido por inhibidores de la HDAC podría explicar el potencial terapéutico del AB en enfermedades neurodegenerativas y, actualmente, es una novedosa vía terapéutica para tratar el deterioro de la memoria en la EA (Govindarajan y cols., 2011). Otros estudios han informado que los inhibidores de HDAC, utilizados en asociación con agonistas de PPAR, son agentes neuroprotectores útiles en modelos experimentales de trastornos neurodegenerativos (Mishra, Chaudhary, y Kumar, 2014).

El hipocampo parece estar afectado por el AB, como sugieren los estudios que muestran que este ácido graso aumenta el volumen de la capa de células granulares y la neurogénesis en esta área del cerebro (Val-Laillet y cols., 2018). Además, el AB mejora la memoria en ratas sometidas a sepsis (Steckert y cols., 2015) y previene el deterioro de la memoria en

ratas envejecidas (Garcez y cols., 2018). Aunque no se ha identificado el mecanismo responsable de estos efectos, el conocimiento actual sobre este tema apunta a la participación de **PPAR $\gamma$** , ya que se ha demostrado que la ingesta de AB, combinada con el agonista de PPAR $\gamma$  pioglitazona, protege contra la respuesta neuroinflamatoria del hipocampo y la pérdida neuronal en animales con deterioro cognitivo inducido por una dieta alta en fructosa (Li y cols., 2019). Además, PPAR $\gamma$  se ha identificado en el hipocampo de ratas adultas y en mayor concentración en las células piramidales del área CA1 (Baghcheghi y cols., 2019). Este hallazgo es coherente con el efecto positivo que tiene la activación de PPAR $\gamma$  sobre los déficits cognitivos espaciales y el deterioro de la LTP (Zhou y cols., 2016), así como con la atenuación de la disminución de la LTP hipocampal desencadenada por A $\beta$  (Costello, O'Leary, y Herron, 2005).

Es de destacar que los agonistas de PPAR $\gamma$  modulan la actividad de AMPK (Lee y Kim, 2010), una quinasa Ser/Thr fundamental para la homeostasis energética (Hardie, Ross, y Hawley, 2012), que también desempeña un papel relevante en la consolidación de la plasticidad sináptica y la memoria a largo plazo (Costa-Mattioli y cols., 2009). De hecho, la activación de AMPK mejora los déficits de memoria espacial en modelos de Alzheimer (Du y cols., 2015). Además, se ha demostrado que AMPK es esencial para mantener los niveles de energía neuronal durante la activación sináptica. Asimismo, su inhibición por compuesto C (C-C) afecta la plasticidad sináptica hipocampal y la formación de la memoria a largo plazo (Marinangeli y cols., 2018).

Todos estos antecedentes convierten a la TB en una molécula prometedora para la puesta a punto de estrategias terapéuticas nutricionales y farmacológicas que permitan mejorar la memoria espacial dependiente del hipocampo.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Considerando que el AB podría revertir el deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo, planteamos la hipótesis de la existencia de una vía en el hipocampo que conecte AGCC, PPAR $\gamma$  y AMPK. Esta vía podría ser la base de los efectos de la TB, un precursor del AB, en la plasticidad sináptica hipocampal relacionada con la memoria espacial, proporcionando a esta sustancia un potencial terapéutico en condiciones de deterioro de la memoria. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar los posibles efectos de la TB sobre la memoria espacial dependiente del hipocampo y estudiar el mecanismo de acción de la misma en la transmisión sináptica y los procesos de plasticidad sináptica hipocampales. Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- I. Analizar el efecto de la TB sobre la memoria espacial dependiente del hipocampo utilizando dietas enriquecidas con esta molécula, que se administrarán de forma aguda y crónica.
- II. Conocer si la TB tiene efectos beneficiosos sobre modelos de deterioro de la memoria espacial mediante experimentos conductuales.
- III. Evaluar los posibles cambios que las dietas con TB inducen sobre la expresión de genes y proteínas relevantes para la transmisión glutamatérgica hipocampal.
- IV. Estudiar los efectos de la TB sobre la transmisión y la plasticidad sináptica hipocampal que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria explorando las vías de señalización de PPAR $\gamma$  y AMPK con el fin de conocer el mecanismo de acción de la TB en estos procesos.

- V. Investigar si la TB es capaz de modular los mecanismos de plasticidad sináptica en diferentes modelos de deterioro de la LTP inducido por otras moléculas como la escopolamina, la anandamida o el producido por las dietas altas en grasa.
- VI. Analizar el efecto de la TB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica.

## MATERIALES Y MÉTODOS





## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1. Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones macho de la cepa C57BL/6J (Charles River, España) adolescentes (5 semanas de edad) y adultos (11 semanas de edad). Los animales se estabularon individualmente, en condiciones controladas de humedad (45-50%) y temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, en las instalaciones de la Universidad CEU San Pablo.

La estabulación y utilización de los animales se realizó cumpliendo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (2010/63/EU) y la Legislación Española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005 y RD 53/2013). Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal de la Universidad CEU San Pablo (PCD-CEU08-112-16).

### 3.2. Diseño experimental

#### – Experimentos *in vivo*

Se evaluó el efecto de la TB sobre la memoria espacial en el laberinto en Y utilizando varios grupos experimentales:

- En el **primer grupo** experimental, se realizó el ensayo en ratones macho adolescentes (5 semanas de edad, grupo 1) que consumieron dietas con distintas concentraciones de TB durante 20 semanas (tratamiento crónico; n=28) o durante 48 horas (tratamiento agudo; n=20). Los animales de este grupo se utilizaron posteriormente para el análisis de la expresión génica y proteica en el hipocampo, la corteza prefrontal y el tejido adiposo, así como para el análisis de diferentes parámetros bioquímicos en plasma.

- Se utilizó un **segundo grupo** de ratones adolescentes (5 semanas de edad; n=48) y adultos (11 semanas de edad; n=48) para caracterizar el efecto de las dietas con TB (48 horas) sobre el deterioro de la memoria inducido por escopolamina (SCOP; grupo 2). A los ratones se les administró (i.p.) una solución de suero salino o SCOP (1 mg/kg), y tras 30 minutos se evaluó la memoria espacial en el laberinto en Y.
- En otra tanda de experimentos (**grupo 3**), se estudió el efecto *in vitro* de la TB sobre la transmisión y la plasticidad sináptica en rodajas de hipocampo de animales tratados con dietas ricas en grasa saturada (SOLF; *Saturated Oil Food*) o insaturada (UOLF; *Unsaturated Oil Food*). Estas dietas se elaboraron en nuestro laboratorio (Plaza y cols., 2019; Fernández-Felipe y cols., 2021) a partir de comida estándar de roedor (60%; SD, Teklad global 2018, Harlan Laboratories, IN, USA) y 40% de aceite de palmiste (SOLF) o aceite de girasol alto oleico (UOLF). Los animales se dividieron en tres grupos, con un peso corporal homogéneo y consumieron *ad libitum* las dietas SD, SOLF o UOLF durante 8 semanas (tratamiento crónico; n=19) o durante 2 horas (tratamiento agudo; n=18) (en este último caso los animales ayunaban 12 horas, previo al consumo de las dietas). En ambos casos, los animales comenzaron a consumir las dietas durante la adolescencia (p35) y, en el caso de los que consumieron las dietas durante 8 semanas lo hicieron hasta la adultez temprana. En todos los experimentos electrofisiológicos, una rodaja de cada animal individual se consideró como n=1.

En todos los animales de los tres grupos se llevó el control del peso corporal y de la ingesta calórica durante el tiempo de duración de los tratamientos.

– **Experimentos *in vitro***

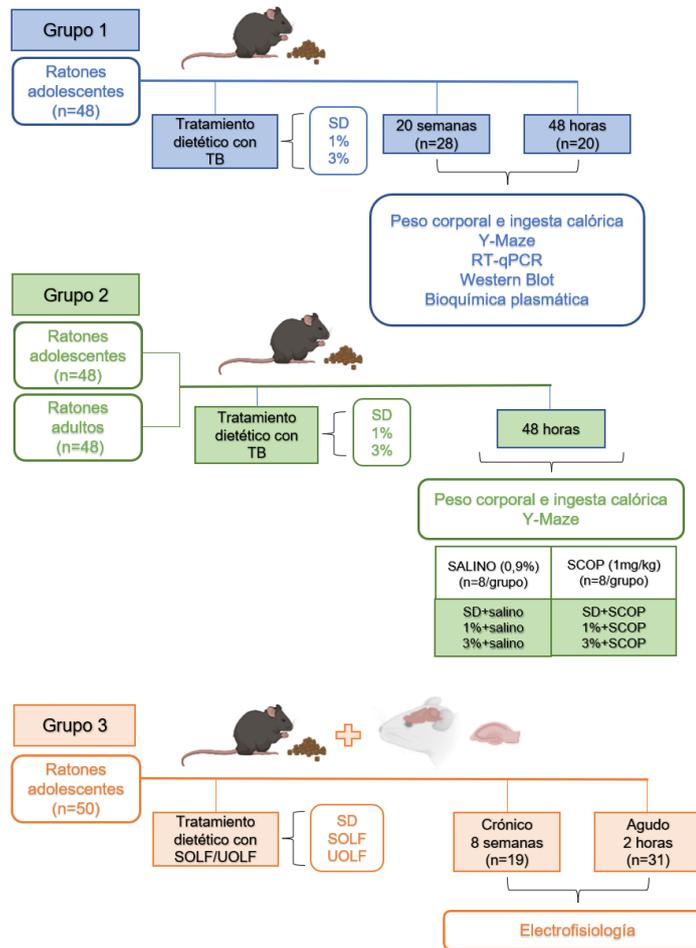
Se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos *in vitro* de registro extracelular con el fin de caracterizar el efecto de la TB sobre la transmisión y la plasticidad sináptica en rodajas de hipocampo de ratones macho adolescentes (5 semanas de edad) *naïve*. Las rodajas se perfundieron con TB y con diferentes fármacos, con el fin de caracterizar su mecanismo de acción y las bases moleculares que subyacen a los procesos de plasticidad en la transmisión glutamatérgica hipocampal. Una rodaja de cada animal individual se consideró como n=1.

Por otro lado, para continuar investigando el papel de la TB en la transmisión glutamatérgica hipocampal, estudiamos el efecto de la TB sobre los niveles de aminoácidos implicados en la transmisión sináptica mediante electroforesis capilar (n=32), utilizando rodajas de hipocampo de ratones macho adolescentes (5 semanas de edad) *naïve*. Para llevar a cabo estos experimentos, las rodajas se perfundieron con distintas concentraciones de TB (30, 75, 150 y 300  $\mu$ M) durante 2 h. Una rodaja de cada animal individual se consideró como n=1.

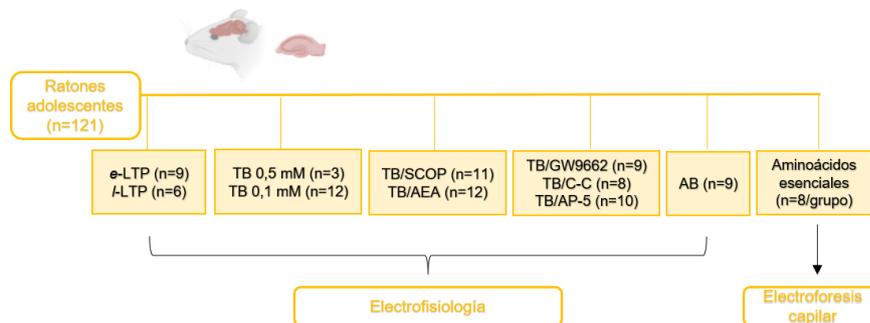
Tanto en los experimentos *in vivo* como en los experimentos *in vitro* se utilizaron exclusivamente ratones macho, ya que este estudio con TB es el primero que hemos llevado a cabo en nuestro laboratorio y ha requerido un elevado número de animales y grupos experimentales para su realización. No obstante, tras esta primera aproximación, no descartamos realizar los mismos ensayos en el futuro utilizando ambos sexos, lo que consideramos imprescindible para un completo conocimiento del efecto de la TB sobre los procesos estudiados en el presente trabajo.

En el siguiente esquema (Figura 13), se describe el diseño experimental de este trabajo y se detallan las características de los diferentes grupos de ratones empleados para llevar a cabo los experimentos descritos anteriormente.

### Experimentos *in vivo*



### Experimentos *in vitro*



**Figura 13. Diseño experimental.** Resumen esquematizado del diseño experimental utilizado para la realización de los diferentes experimentos de este trabajo. Experimentos *in vivo*: grupo 1, tratamiento dietético crónico y agudo con TB en ratones macho adolescentes; grupo 2, tratamiento dietético agudo con TB y posterior deterioro cognitivo inducido mediante SCOP en ratones macho adolescentes y adultos; grupo 3, tratamiento dietético crónico y agudo con las dietas SOLF y UOLF en ratones macho adolescentes y registro electrofisiológico con perfusión de TB. Experimentos *in vitro*: registro electrofisiológico y estudio de los aminoácidos de rodajas de hipocampo de ratones macho adolescentes naïve.

### 3.3. Tratamiento dietético

Se han utilizado tres dietas elaboradas en nuestro laboratorio a partir de dieta estándar de roedor (Panlab, S.L.) a la que se añadieron diferentes cantidades (0,5%, 1% y 3%; Tabla 1) de TB (Sigma-Aldrich).

Para elaborar estas dietas se utilizó comida estándar de roedor finamente triturada, que se mezcló con agua y con la cantidad correspondiente de TB (Tabla 1) hasta conseguir una masa homogénea, a partir de la cual se elaboraron *pellets* esféricos (diámetro de 3 cm aproximadamente).

**Tabla 1. Composición de las dietas con TB.** Cantidades de pienso estándar de roedor y TB para la elaboración de las diferentes dietas con TB.

	<b>SD</b>	<b>0,5%</b>	<b>1%</b>	<b>3%</b>
<b>Comida estándar de roedor</b>	10 g	9,95 g	9,90 g	9,70 g
<b>Agua</b>	7 mL	6,95 mL	6,90 mL	6,70 mL
<b>Tributirina</b>	-	1,94 mL	3,88 mL	11,63 mL

En todos los casos, las dietas con TB se suministraron una vez que los animales habían permanecido siete días de aclimatación en las instalaciones del animalario.

En el primer grupo experimental (grupo 1) se utilizaron ratones macho de 5 semanas, alimentados *ad libitum* con las dietas enriquecidas con TB; el grupo control consumió *ad libitum* comida estándar (SD). Los animales permanecieron con esta alimentación durante 20 semanas con el objetivo de evaluar los efectos de la TB a largo plazo (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Tratamiento dietético con TB durante 20 semanas (grupo 1).

<b>DIETAS CON TB DURANTE 20 SEMANAS (Grupo 1; n=28)</b>	
<b>Subgrupos</b>	<b>Tipo de dieta</b>
<b>SD (n=7)</b>	100% dieta estándar de roedor
<b>0,5% (n=7)</b>	Dieta estándar enriquecida un 0,5% con TB
<b>1% (n=7)</b>	Dieta estándar enriquecida un 1% con TB
<b>3% (n=7)</b>	Dieta estándar enriquecida un 3% con TB

Se utilizó una segunda tanda (grupo 1) de ratones macho de 5 semanas de edad, que consumieron *ad libitum* las dietas con TB durante 48 horas con el fin de evaluar el efecto agudo de estas dietas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tratamiento dietético con TB durante 48 horas en animales adolescentes (grupo 1).

<b>DIETAS CON TB DURANTE 48 HORAS (Grupo 1; n=20)</b>	
<b>Subgrupos</b>	<b>Tipo de dieta</b>
<b>SD (n=6)</b>	100% dieta estándar de roedor
<b>1% (n=7)</b>	Dieta estándar enriquecida un 1% con TB
<b>3% (n=7)</b>	Dieta estándar enriquecida un 3% con TB

Posteriormente, se utilizó otra tanda de ratones (grupo 2) macho adolescentes (5 semanas de edad) y adultos (11 semanas de edad) para caracterizar el efecto de las dietas con TB durante 48 horas sobre el deterioro de la memoria inducido por escopolamina. En esta tanda de animales obtuvimos los siguientes grupos:

**Tabla 4.** Tratamiento dietético con TB durante 48 horas en animales adolescentes y adultos (grupo 2).

<b>DIETAS CON TB DURANTE 48 HORAS (Grupo 2)</b>			
<b>Adolescentes</b>		<b>Adultos</b>	
<b>Subgrupos</b>	<b>Tipo de dieta</b>	<b>Subgrupos</b>	<b>Tipo de dieta</b>
<b>SD (n=8)</b>	100% dieta estándar de roedor	<b>SD (n=8)</b>	100% dieta estándar de roedor
<b>SD+SCOP (n=8)</b>		<b>SD+SCOP (n=8)</b>	
<b>1% (n=8)</b>	Dieta estándar enriquecida con TB (1%)	<b>1% (n=8)</b>	Dieta estándar enriquecida con TB (1%)
<b>1%+SCOP (n=8)</b>		<b>1%+SCOP (n=8)</b>	
<b>3% (n=8)</b>	Dieta estándar enriquecida con TB (3%)	<b>3% (n=8)</b>	Dieta estándar enriquecida con TB (3%)
<b>3%+SCOP (n=8)</b>		<b>3% + SCOP (n=8)</b>	

Finalmente, se utilizó una última tanda de ratones (grupo 3), en la que los animales consumieron de forma crónica dos dietas diferentes altas en grasa, que se elaboraron en nuestro laboratorio a partir de comida estándar de roedor (60%; SD) y 40% de aceite de palmiste (SOLF) o aceite de girasol alto oleico (UOLF). Estos animales se utilizaron para evaluar el efecto *in vitro* de la TB sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampales y se dividieron en los siguientes grupos:

**Tabla 5.** Tratamiento dietético (crónico y agudo) con dietas altas en grasas saturadas (SOLF) e insaturadas (UOLF).

<b>DIETAS ALTAS EN GRASAS SATURADAS (SOLF) E INSATURADAS (UOLF) (Grupo 3)</b>			
<b>Tratamiento crónico (8 semanas)</b>		<b>Tratamiento agudo (2 horas)</b>	
<b>Subgrupos</b>	<b>Tipo de dieta</b>	<b>Subgrupos</b>	<b>Tipo de dieta</b>
<b>SD (n=6)</b>	100% dieta estándar de roedor	<b>SD (n=12)</b>	100% dieta estándar de roedor
<b>SOLF (n=6)</b>	60% dieta estándar + 40% aceite de palmiste	<b>SOLF (n=13)</b>	60% dieta estándar + 40% aceite de palmiste
<b>UOLF (n=7)</b>	60% dieta estándar + 40% aceite de girasol alto oleico	<b>UOLF (n=6)</b>	60% dieta estándar + 40% aceite de girasol alto oleico

### **3.4. Control del peso corporal e ingesta calórica**

Con el fin de conocer la evolución del peso corporal y la ingesta en función del tipo de dieta y del tratamiento utilizados, los animales se pesaron una vez por semana (siempre el mismo día y a la misma hora; 9:00 h) y la comida se pesó dos veces por semana (siempre los mismos días y a las mismas horas; 9:00 h y 18:00 h) para calcular las ingestas diurnas y nocturnas. La ingesta calórica se calculó en kcal para cada uno de los animales que consumieron las dietas con TB (grupos 1 y 2) o las dietas SOLF y UOLF (grupo 3), considerando las kcal/g de cada dieta (SD=3,1 kcal/g; TB=7,0 kcal/g; SOLF=5,3 kcal/g; UOLF=5,3 kcal/g). El control del peso corporal y de la ingesta calórica se llevó a cabo en los animales de los tres grupos.

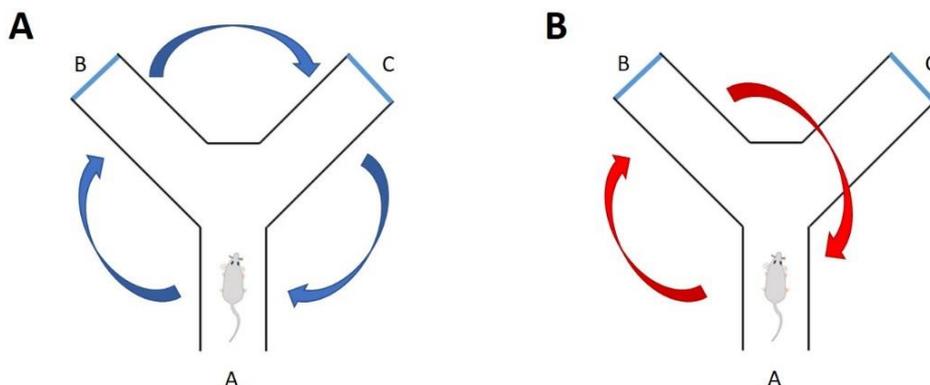
### **3.5. Valoración de la memoria espacial mediante el laberinto en Y**

Se evaluó la memoria espacial mediante el análisis de la alternancia espontánea en el laberinto en Y en los animales de los grupos 1 y 2. Este ensayo se basa en la tendencia natural de los roedores a explorar nuevos entornos, de forma que los animales eligen un camino diferente al elegido previamente, fenómeno conocido como alternancia espontánea. El laberinto consta de una estructura en forma de Y (50 x 19 x 35 cm) con tres brazos de plástico negro opacos a un ángulo de 120° uno del otro.

Los animales se llevaron a la sala de experimentación una hora antes del inicio de cada sesión para su habituación. En cada sesión, se colocó un animal en uno de los tres brazos permitiéndole explorar el laberinto libremente durante diez minutos, durante los cuales se registró tanto la entrada en los diferentes brazos (con las cuatro patas dentro del brazo) como el tiempo de decisión, es decir, el tiempo en el centro del laberinto (en segundos).

Mediante el registro de la secuencia de entrada en los distintos brazos, se calcularon las alternancias correctas, es decir, la entrada a tres brazos diferentes de forma consecutiva, mientras que la repetición de un brazo durante una misma triada se consideró una alternancia incorrecta (Figura 14). Por ejemplo, de la secuencia de brazos “A, C, B, C, A, B, A, C, B, A”, la primera triada “A, C, B” es una alternancia correcta, mientras que la siguiente “C, B, C” es incorrecta. Se obtuvo así el porcentaje de alternancia, calculado como el número de alternancias correctas dividido entre todas las alternancias realizadas (es decir, el número de brazos visitados menos dos) multiplicado por 100. Para el ejemplo anterior:  $\left[ \frac{6}{10-2} \right] * 100 = 75\%$ . El porcentaje de alternancias correctas indica el estado de la memoria, de manera que, un menor porcentaje indica un mayor deterioro de la misma.

Este procedimiento se realizó en seis ensayos diferentes (correspondientes a las semanas 9, 11, 13, 15, 17 y 19 de tratamiento dietético) en el grupo de animales que consumieron las dietas con TB durante 20 semanas (grupo 1) y en un solo ensayo con los animales (adolescentes y adultos) que consumieron las dietas con TB durante 48 h (grupo 1 y 2).



**Figura 14. Laberinto en Y.** Representación de una alternancia correcta (A) y una alternancia incorrecta (B) en el Laberinto en Y.

### **3.6. Obtención de las muestras**

Tras el sacrificio de los animales, se diseccionaron el corazón, el hígado, los tejidos adiposos lumbar (TAL), subcutáneo (TAS) y epididimal (TAE), el hipocampo y la corteza prefrontal (CPF). Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización. También se recogieron muestras de sangre troncal que se recolectaron en tubos tapizados con propileno-EDTA (microvettes 3 mL, Sarstedt, Alemania) con el fin de obtener el plasma por centrifugación a 4°C durante 20 minutos a 4.000 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf Iberica, España). Las muestras de plasma se guardaron en tubos eppendorf a -20°C hasta su utilización para determinaciones bioquímicas.

### **3.7. Determinaciones bioquímicas en plasma**

El análisis de los diferentes parámetros bioquímicos plasmáticos que se detallan a continuación se llevó a cabo en los animales del grupo 1.

#### **3.7.1. Determinación de la glucosa plasmática**

La concentración de glucosa en plasma se cuantificó a través de una sucesión de dos reacciones enzimáticas redox, que conduce a la producción de quinoneimina roja, con compuesto coloreado (Método de Trinder, Biolabo, Francia).

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos empleando 2  $\mu$ L de plasma y 200  $\mu$ L de reactivo. Tras incubar 10 min a 37°C se determinó la absorbancia a 500 nm. Se empleó como patrón de glucosa un estándar de 100 mg/dL.

#### **3.7.2. Determinación de colesterol en plasma**

La concentración de colesterol en plasma se realizó mediante un método colorimétrico enzimático utilizando un kit comercial (Spinreact, España). Brevemente, este método se basa en la hidrólisis de los ésteres

del colesterol para liberar colesterol, que mediante una serie de reacciones enzimáticas se oxida para acabar dando quinoneimina.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos y por cada pocillo se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de plasma y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo. Tras incubar 10 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 505 nm. Se utilizó un patrón de colesterol de 200 mg/dL.

### **3.7.3. Determinación de triglicéridos plasmáticos**

La concentración de triglicéridos en plasma se determinó mediante un método colorimétrico empleando un kit comercial (Spinreact, España). Brevemente, este método se basa en la hidrólisis de los triglicéridos para liberar glicerol, que mediante una serie de reacciones enzimáticas se oxida para acabar dando peróxido de hidrógeno, que se emplea para producir quinona, un compuesto coloreado.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos usando 2  $\mu\text{L}$  de plasma y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo. Tras incubar 10 min a 37°C se midió la absorbancia a 505 nm. Se utilizó como patrón un estándar de triglicéridos a 200 mg/dL.

### **3.7.4. Determinación de ácidos grasos no esterificados plasmáticos**

La concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA; del inglés *non-esterified fatty acids*) se determinó mediante un método colorimétrico enzimático utilizando un kit comercial (ASC-ACOD, Wako Bioproducts, USA). Brevemente el método se basa en la condensación del ácido graso libre con coenzima A y posterior oxidación a alqueno, con la consecuente producción de peróxido de hidrógeno, que oxida al 3-metil-N-etil-N-( $\beta$ -hidroxietil)-anilina (MEHA), dando lugar a un compuesto coloreado rojo (quinoneimina).

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, a los que se añadieron 3,5  $\mu\text{L}$  de muestra y 150  $\mu\text{L}$  de reactivo A. Tras incubar 3 min a 37°C se

añadieron 75  $\mu\text{L}$  de reactivo B y se incubó la mezcla 4,5 min adicionales y se determinó la absorbancia a 546 nm. Se utilizó un patrón de NEFA de 28,2 mg/dL.

### **3.7.5. Determinación de los niveles plasmáticos de insulina**

La concentración de insulina plasmática se determinó mediante un inmunoensayo enzimático específico para insulina de ratón (ELISA, Mercodia, Suecia).

El ensayo se llevó a cabo en pocillos tapizados con anticuerpos anti-insulina de ratón, a los que se les añadió 10  $\mu\text{L}$  de plasma y 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-insulina conjugado con peroxidasa. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente y agitación suave, la placa se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado (x4). A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) a cada pocillo. Al cabo de 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, para parar la reacción, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de HCl 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm. Se utilizó una curva patrón estándar de insulina (0,2-6,5 ng/L).

### **3.7.6. Determinación de los niveles plasmáticos de leptina**

La concentración de leptina plasmática se determinó mediante un inmunoensayo enzimático específico para leptina de ratón (ELISA, Phoenix Pharmaceuticals, Suecia).

El ensayo se llevó a cabo en pocillos tapizados con anticuerpos anti-leptina de ratón, a los que se les añadió 100  $\mu\text{L}$  de plasma (previa dilución 1:20). Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente y agitación suave, la placa se lavó con 350  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado (x3). A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-leptina biotinilado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de un conjugado estreptavidina-peroxidasa, durante 30 min. Al cabo de ese tiempo se volvió a lavar (x3) y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de TMB a cada pocillo. Tras 10 min a temperatura ambiente en oscuridad, para parar la reacción,

se añadieron 100  $\mu$ L de HCl 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm. Se utilizó una curva patrón estándar de leptina (62,5-4.000 ng/L).

### **3.7.7. Determinación de los niveles plasmáticos de adiponectina**

La concentración de adiponectina plasmática se determinó mediante un inmunoensayo enzimático específico para adiponectina de ratón (ELISA, Abcam, Reino Unido). El ensayo se realizó en pocillos tapizados con un anticuerpo anti-adiponectina de ratón. En cada pocillo se añadieron 50  $\mu$ L de muestra (dilución 1:400). Tras 2 h de incubación, la placa se lavó 5 veces con 200  $\mu$ L de tampón de lavado. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ L de anticuerpo biotinilado y se incubó 1 h. Posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo del conjugado estreptavidina/peroxidasa, y se incubó 30 min. Se volvió a lavar 5 veces y se añadieron 50  $\mu$ L de TMB, el cual fue incubado durante 12 min en oscuridad, dando lugar al compuesto coloreado azul. La reacción enzimática finalizó mediante la adición de 50  $\mu$ L de “*Stop Solution*”, dando lugar al compuesto coloreado amarillo. La absorbancia se midió a 450 nm. El ensayo se validó mediante la utilización de una curva patrón de adiponectina (0,78-50,00 ng/mL).

### **3.8. Determinación de lípidos en el tejido adiposo**

La extracción de lípidos se realizó a partir de 100 mg de TAS de los animales de los grupos 1 y 2 siguiendo el método de *Folch* (Herrera y Ayanz, 1972). Las muestras se colocaron en tubos de vidrio con 3 mL de una solución cloroformo/metanol (proporción 2:1), agitándose durante 12 h en un rotatubos de inversión (AT20, Magna, España). Posteriormente, se separó el disolvente y se añadieron 3 mL de la solución cloroformo/metanol, que se agitaron durante 2 h adicionales (este paso se repitió dos veces más). A continuación, se reunieron todas las fases orgánicas y se les añadió 3 mL de agua destilada. Se mezclaron las fases mediante inversión y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo,

se retiró la fase acuosa (fase superior) y se dejó secar a 60°C, obteniéndose así el contenido lipídico total. Los resultados se expresaron en mg lípidos/g de tejido.

### **3.9. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR)**

Para medir la expresión de diferentes genes relacionados con la transmisión glutamatérgica y la plasticidad sináptica en el hipocampo y la CPF y genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y triglicéridos en el TAS, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR).

Para extraer el ARN mensajero (ARNm) se utilizó el método del trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987) que se basa en el aislamiento de ARNm utilizando una mezcla de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo. Para ello, se homogenizaron las muestras de hipocampo y CPF de los animales del grupo 1 mediante dos ciclos de 1 min en un *TissueLyser* (Qiagen, Alemania) con una esfera de acero de 5 mm de diámetro (Qiagen, Alemania) en 500  $\mu$ L del trizol (Invitrogen, EEUU). Posteriormente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 min para favorecer el lisado celular y la solubilización del ARN. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo a cada muestra, y se dejaron reposar otros 10 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 15 min a 10.000 rpm y 4°C, las muestras se separaron en diferentes fases: un estrato inferior que contenía el cloroformo y, una fase superior acuosa, a partir de la cual se precipitó el ARN, añadiendo 250  $\mu$ L de isopropanol. Posteriormente, se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y se realizó otra centrifugación de 10 min a 10.000 rpm y 4°C. Se descartó en este caso el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50  $\mu$ L de etanol al 75% (v/v) durante 5 min. Finalmente, se dejó evaporar el etanol y se resuspendió

el precipitado en 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa, para evitar su degradación.

Para evaluar el efecto de las dietas con TB sobre el TAS de los animales del grupo 1, se cuantificaron genes relacionados con el desarrollo de este tejido y su carácter endocrino. En este caso la extracción del ARN total se realizó en dos etapas. En la primera, se pesaron 50 mg de tejido y se homogenizaron en 700  $\mu\text{L}$  de trizol (utilizando esferas de acero de 5 mm) en un *TissueLyser* (Qiagen, Alemania) (3 ciclos de 2 min a 50 rpm). A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo a las muestras y se dejaron 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una centrifugación de 15 min a 12.000 rpm y 4°C. Por último, se retiró la fase acuosa y se añadió etanol al 75% (v/v). En una segunda etapa, se emplearon columnas de aislamiento de ARNm (RNAspin Mini RNA Isolation Kit, GE Healthcare, España), siguiendo el protocolo que dicta el producto. En el último paso, el ARN se extrajo de las columnas añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa.

Se cuantificó el ARN total mediante la ratio de absorbancia 260/280 nm utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 1000; Thermo Scientific, EEUU).

Una vez cuantificado el ARN, se llevó a cabo la retrotranscripción o transcripción inversa (RT; del inglés *Reverse Transcription*) para la síntesis de ADN complementario (ADNc), a partir de 4  $\mu\text{g}$  de ARNm utilizando el kit de transcriptasa inversa SuperScript II (Bio-Rad, Hercules, EEUU). Para ello, se utilizó un termociclador CFX96 (Bio-Rad, USA) con las siguientes condiciones: 5 min a 25°C, 20 min a 46°C y 1 min a 95°C. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la realización de las qPCR.

Todas las muestras se analizaron por duplicado con un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ /pocillo. Cada pocillo contenía 2  $\mu\text{L}$  de ADNc y 8  $\mu\text{L}$  de un mix compuesto por 5  $\mu\text{L}$  de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara, Japón), 1,5  $\mu\text{L}$  de *primer forward* y 1,5  $\mu\text{L}$  de *primer reverse* específicos para cada gen analizado. Los *primers* de los genes de interés se diseñaron utilizando el software DNADynamo (SeqBuilder) y se enumeran en la Tabla 6. La qPCR

se llevó a cabo en un termociclador CFX96 (CFX96 Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad, EEUU), con las condiciones generales: 10 min a 95°C, cuarenta ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Se usaron como genes de referencia la  $\beta$ -actina y el ARN ribosomal 18s, para estimar la expresión relativa de los genes de interés. El ciclo umbral (Ct) de los diferentes genes de interés y de los dos genes de referencia para cada muestra se obtuvo del software proporcionado por el termociclador CFX96. Se empleó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para determinar la expresión relativa (Schmittgen y Livak, 2008).

**Tabla 6.** Secuencias de los “primers” utilizados para medir los diferentes genes de interés mediante RT-qPCR.

GENES	FORWARD	REVERSE
<b>18-S</b>	GGGAGCCTGAGAAACGGC	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT
<b>Act<math>\beta</math></b>	TGGTGGGAATGGGTCAGAAGGACTC	CATGGCTGGGGTGTGAAGGTCTCA
<b>Gria1</b>	CAGGTGCGTTTTGAAGGTTTGACAG	CGTATTTGCCGTCGCTGACAATCTC
<b>Gria2</b>	ACAGTGCATTTCCGGTAGGG	CCTTTGAGGTCAGGTCCGAT
<b>Grin1</b>	GACTGGCCGTGTGGAATTCAATGAG	CACTATCTTTAGTCTGGTGGACATCTG
<b>Grin2A</b>	GAGCGTTCAGAAGTGGTGGGA	ACGAAGACAGCAATGGCAGA
<b>Grin2B</b>	AGGTCTTTGCTTCTACGGGC	GCTGGCTGCTCATAACCTCA
<b>Slc1a3</b>	GCAAGACACTGACACGCAAG	ATACGGTCGGAGGGCAAATC
<b>Ppara</b>	GTACGGCAATGGCTTTATCACACGC	GAAGGTGTCATCTGGATGGTTGCTC
<b>Pparg</b>	CATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTG	TTGATCGCACTTTGGTATTCTTGGAGC
<b>Lep</b>	GGCTTTGGTCTATCTGTCTTATGTTT	CCTGTTGATAGACTGCCAGAGTCTG
<b>Lepr</b>	GGCACCATTTCCGCTTCAAT	TCTCTTGCTCCTCACCTGGA
<b>Insr</b>	ATGGGCAGTTTGTGGAACGGTGCTG	ATGGTATAGCCAGACGGGCACTCG
<b>Adipoq</b>	CTCCTGCTTTGGTCCCTCC	CTCCAGCCCCACACTGAAC
<b>Adipor1</b>	CCTGGCTCTATTAATCCTTC	GAACACTCCTGCTCTTGTCT
<b>Adipor2</b>	ACTCTGGTCTACAACCTGACA	GTGTTTGGCTGGCTCGTTC
<b>Aqp-7</b>	CCCGGTTGTTCACTTTATTGCTGG	TTCTTGTATGATGCAGTTACCTTCTGG
<b>Hsl</b>	GGAACTAAGTGGACGCAAGC	TTGACATCAGAGGGTGTGGA
<b>Lpl</b>	TCGCTCTCAGATGCCCTACAAAGTG	ATGAGCAGTTCTCCGATGTCCACC

### 3.10. Detección de proteínas por *Western Blot*

Para evaluar el efecto de las dietas con TB sobre la expresión de proteínas hipocampales implicadas en memoria y plasticidad sináptica, se utilizó la técnica de *Western Blot*, basada en la separación de proteínas en función de su peso molecular y su detección y cuantificación mediante inmunquímica, en muestras procedentes de los animales adolescentes que consumieron las dietas con TB durante 48 horas (grupo 1).

Se homogenizaron las muestras de hipocampo mediante dos ciclos de 1 min en *TissueLyser* (Qiagen, Alemania) con una esfera de acero de 5 mm de diámetro (Qiagen, Alemania) en 500  $\mu$ L de tampón de lisis frío (0,42 M NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,9), 1 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 % glicerol, 1 mg/mL aprotinina, 1 mg/mL leupeptina, 1 mg/mL TLCK, 20 mM NaF, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 2 mM PMSF). Para favorecer el proceso de extracción, los homogenados se sometieron a tres choques térmicos consecutivos (1 min en nitrógeno líquido,  $-80^\circ\text{C}$ ; 1 min en baño termostático,  $37^\circ\text{C}$ ). A continuación, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Al finalizar la centrifugación, se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas y se cuantificaron por colorimetría mediante el método de *Bradford* (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Este método se basa en la capacidad del reactivo *Bradford* (Coomassie Brilliant Blue G-250) de virar de rojo a azul en contacto con las proteínas. La intensidad de este azul, medida mediante un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm, es proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra y se interpola de la recta estándar creada con concentraciones conocidas de BSA. Posteriormente, se ajustó la concentración de proteína a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de *Buffer Laemli* (0,125 mM Tris (pH 6,8), 2% SDS, 25% glicerol, 5%  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ , 25% agua destilada y 0,01% azul de bromofenol) a cada muestra.

Las muestras ajustadas se hirvieron a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 min y se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína de cada muestra en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7%. Dichos geles se sometieron a un voltaje constante de 120 V en tampón de electroforesis (0,2 M glicina, 0,025 M Tris y 0,1 % SDS)

durante 1 h, para provocar la migración de las proteínas en función de su relación carga/masa. Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con poros de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro (GE Healthcare, España) utilizando un sistema de transferencia *Trans-blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, EEUU). Se utilizó un protocolo de peso molecular mixto (2,5 A, 25 V, 7 min) debido a la variedad en los pesos moleculares de las proteínas de interés (Tabla 7).

Una vez transferidas las membranas, se lavaron 5 min (x3) con una solución de lavado (0,1% leche desnatada en polvo, 0,5% Tween-20 en una solución al 50% de PBS), y se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo más concentrada en leche (5%) durante 1 h. Tras otros tres lavados de 5 min, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés durante 24 h a 4°C en agitación (Tabla 7). Posteriormente, se volvieron a lavar las membranas (3x5 min) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, en función del origen del anticuerpo primario, es decir, anti-*rabbit* o anti-*mouse* IgG conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, USA), durante 1 h a temperatura ambiente y a una dilución 1/5000. A continuación, tras lavar las membranas (3x5 min), se incubaron con un reactivo quimioluminiscente (ECL *prime western blotting detection reagent kit*; GE Healthcare, UK) durante 5 min y se revelaron utilizando el aparato *ChemiDoc XRS+ Imaging System* (Bio-Rad, España). Este reactivo permite detectar las bandas de proteínas a través una reacción enzimática, basada en la oxidación del luminol por la presencia de peroxidasa en condiciones alcalinas. El densitometrado de dichas bandas se realizó utilizando el programa *Image Lab* (Bio-Rad, España).

Con el fin de verificar la cantidad de proteína cargada de cada muestra, las membranas se incubaron también con el anticuerpo primario para  $\beta$ -actina (Affinity Bioreagents, EEUU) para expresar los resultados como la ratio entre la densidad óptica de la proteína de interés y la densidad óptica de  $\beta$ -actina. Se utiliza  $\beta$ -actina como control de carga ya que es una proteína estructural cuya expresión no varía con el tratamiento.

**Tabla 7.** Características de los anticuerpos utilizados para cuantificar la expresión proteica mediante “Western Blot”.

PROTEÍNA	DESCRIPCIÓN	DILUCIÓN	REFERENCIA
AMPAR1	Mouse Monoclonal, 110 kDa	1/1000	MAB2263 (Merck Millipore)
AMPAR2	Rabbit Monoclonal, 100 kDa	1/500	49694 (Signalway Antibody)
NMDAR1	Rabbit Monoclonal, 100 kDa	1/200	ab68144 (Abcam)
NMDAR2A	Rabbit Monoclonal, 165 kDa	1/2000	ab124913 (Abcam)
NMDAR2B	Mouse Monoclonal, 180 kDa	1/500	ab28373 (Abcam)
$\beta$ -actina	Mouse Monoclonal, 42 kDa	1/5000	A5316 (Sigma)
Anti- <i>mouse</i> IgG	Goat Monoclonal	1/5000	SC-516102 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti- <i>rabbit</i> IgG	Mouse Monoclonal	1/5000	SC-2357 (Santa Cruz Biotechnology)

### 3.11. Registro electrofisiológico para el estudio de la plasticidad sináptica hipocampal

Para caracterizar el efecto de la TB sobre la transmisión y la plasticidad sináptica en el hipocampo, se valoró la transmisión sináptica basal y la LTP mediante ensayos *in vitro* de electrofisiología en rodajas de hipocampo de ratones *naïve*. Además, se estudió el efecto *in vitro* de la TB sobre el deterioro de la LTP, y en estos ensayos, además de animales *naïve*, se utilizaron rodajas de hipocampo de los animales tratados con las dietas altas en grasas saturadas (SOLF) e insaturadas (UOLF) (grupo 3).

Los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajeron sus cerebros y se colocaron en una solución Krebs (KRB; 109 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 26,2 mM NaHCO<sub>3</sub> y 11 mM glucosa) fría y oxigenada (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Tras extraer los hipocampos de ambos hemisferios, se empleó un cortador de tejido manual (*Tissue Slicer*, Stoelting, EEUU) para realizar rodajas transversales con un grosor de 400  $\mu$ m. Estas rodajas de hipocampo se colocaron en una

cámara humidificada y oxigenada a temperatura ambiente (20-25°C) y en contacto con la solución de KRB durante al menos dos horas, para permitir la estabilización neuronal tras la extracción.

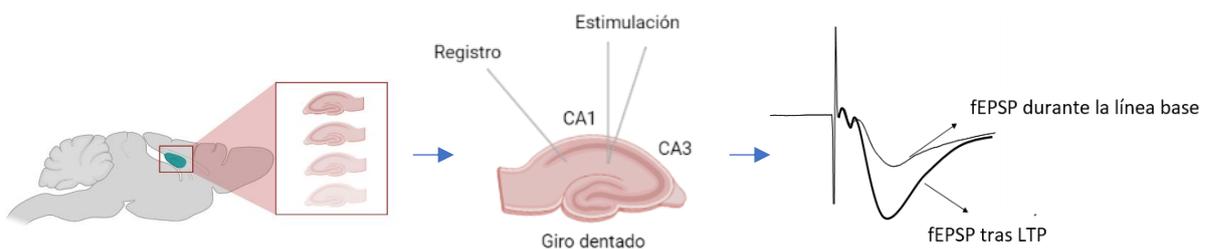
Tras el periodo de estabilización, se transfirió una rodaja a una cámara de registro electrofisiológico, donde recibió una perfusión constante de KRB a una velocidad de 1,8-2 mL/min y una temperatura de 31-32°C. Los potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP) se provocaron estimulando las fibras colaterales-comisurales de *Schaffer* con pulsos eléctricos bifásicos (30-70 mA y 100  $\mu$ s a 0,033 Hz) aplicados a través de un microelectrodo bipolar aislado con tungsteno (0,5 M $\Omega$ ), y se registraron en el área CA1 *stratum radiatum* usando un microelectrodo con aislamiento de tungsteno de 1 M $\Omega$  (Figura 15).

Los pulsos eléctricos se aplicaron por un generador de pulsos Master 8 (AMPI, Israel) y el electrodo de registro se conectó a un amplificador AI-402 (Axon Instruments, EEUU), conectado a su vez a un segundo amplificador *CyberAmp 320 signal conditioner* (Axon Instruments, EEUU), de forma que la amplitud de la señal fuese lo suficientemente grande como para ser registrada. Las respuestas generadas se digitalizaron a 25-50 Hz mediante la *Digidata 1320A* (Axon Instruments, EEUU) y se almacenaron en un ordenador Pentium IV IBM utilizando el *Software pCLAMP 9.0* (Axon Instruments, EEUU).

Los axones de las fibras colaterales de *Shaffer* se estimularon cada 30 s y la intensidad del estímulo se ajustó para obtener una pendiente máxima de fEPSP del 30-40%. Tras obtener una respuesta sináptica estable durante al menos 20 min como línea base, se aplicaron los estímulos eléctricos necesarios para el establecimiento de la LTP (Figura 15). En algunos experimentos se evaluó la e-LTP mediante la aplicación de un tren de estimulación de alta frecuencia (100 Hz) de 200 ms/s de duración y en otros experimentos, se evaluó la i-LTP mediante la aplicación de cuatro estímulos de alta frecuencia (100 Hz) de 200 ms/s de duración cada 20 s. La transmisión sináptica se evaluó midiendo la pendiente inicial del fEPSP, y los datos se normalizaron con respecto a la media de los valores de los

20 min de línea base para cada rodaja. Con el fin de evaluar la transmisión sináptica basal, se analizaron las curvas *Input/Output* (I/O) durante el periodo en que se generó la línea base. En el caso de la perfusión de algún compuesto, se analizaron las curvas I/O una vez que el tiempo de perfusión era suficiente y estable.

Para llevar a cabo los diferentes experimentos, se prepararon soluciones madre de los siguientes fármacos: bromhidrato de escopolamina (SCOP; antagonista muscarínico), tributirina (TB; profármaco del ácido butírico) y ácido butírico (AB; ácido graso de cadena corta) diluidos en KRB. Se preparó ácido L-2 amino-5-fosfonovalérico (AP-5; antagonista de los receptores NMDA) en agua destilada, soluciones de anandamida (AEA), GW9662 (antagonista PPAR $\gamma$ ) y Compuesto C (C-C; inhibidor de AMPK) en DMSO. La concentración final de DMSO fue <0,05% en todos los casos. Los fármacos se agregaron a la cámara de registro a una concentración final de: 0,1 mM (SCOP), 0,1 y 0,5 mM (TB), 75  $\mu$ M (AB), 50  $\mu$ M (AP-5), 30  $\mu$ M (AEA), 2  $\mu$ M (GW9662) y 5  $\mu$ M (C-C). Todos ellos se perfundieron un total de 40 min, inmediatamente después del período basal. La estimulación de alta frecuencia se aplicó una vez transcurridos los primeros 20 min de perfusión del fármaco y, tras los siguientes 20 min de perfusión del fármaco, éste se retiró y se lavó la rodaja con KRB. Todos los fármacos se adquirieron de Sigma (CO, EEUU).



**Figura 15. Esquema del registro electrofisiológico en rodajas de hipocampo y representación de la señal obtenida durante la línea base y tras la inducción de la LTP. fEPSP: Potencial postsináptico excitatorio de campo; LTP: Potenciación a largo plazo (figura realizada utilizando la web Biorender).**

### 3.12. Determinación analítica de aminoácidos en rodajas de hipocampo mediante electroforesis capilar

Con el fin de estudiar el efecto de la TB sobre los niveles de aminoácidos implicados en la transmisión sináptica, éstos se cuantificaron en rodajas de hipocampo incubadas con TB y AB. La cuantificación se llevó a cabo mediante electroforesis capilar.

Las rodajas de hipocampo se transfirieron a placas de 24 pocillos (tres rodajas/pocillo), que contenían 2 mL de KRB a los que se añadió TB/AB hasta alcanzar concentraciones 30, 75, 150 y 300  $\mu\text{M}$ . Las rodajas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con oxigenación constante siguiendo un protocolo utilizado previamente en nuestro laboratorio (Naranjo y cols., 2020). Transcurrido este tiempo, se homogenizaron (1 min) en 150  $\mu\text{L}$  de KRB en un *Tissue Lyser* (Qiagen, Alemania) con unas esferas de 5 mm de diámetro (Qiagen, Alemania). A continuación, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se rescató y sobre él se realizó una cuantificación de proteínas por el método BCA. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el día del análisis.

La solución de derivatización se preparó disolviendo 4-fluor-7-nitrobenzofurazan (NBD-F, Cymit, España) a una concentración de 40 mM en 500  $\mu\text{L}$  de metanol que se mezcló con 500  $\mu\text{L}$  de HCl (0,1 M), dando lugar a una concentración final de 20 mM de NBD-F. El tampón de elución empleado durante el análisis consistió en 90 mM de tampón borato a pH 10,25 (preparado con ácido bórico ajustado al pH con NaOH 2 M), 12,5 mM de  $\beta$ -ciclodextrina nativa y un suplemento del 2% de metanol. Las muestras se descongelaron el día del análisis, se agitaron durante 1 min mediante vórtex y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 3 min. A continuación, en un tubo de vidrio se añadieron 45  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, 15  $\mu\text{L}$  de estándar interno (*Internal Standard*, IS, ácido  $\alpha$ -aminoadipídico) a una concentración de 150  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{L}$  de la solución de derivatización y 150  $\mu\text{L}$  de una solución 10 mM de tampón borato pH 9,0. Tras mezclar durante 10 s, la reacción de

derivatización se llevó a cabo a 60°C durante 17 min en oscuridad. Inmediatamente después, las muestras se mantuvieron a 4°C al menos 30 min.

La determinación de aminoácidos se realizó en un sistema P/ACE MDQ (Beckman-Coulter PA 800plus, Fullerton, CA, USA), equipado con un detector LIF con una fuente de argón operante a  $\lambda_{\text{EXC}}$  de 488 nm y una  $\lambda_{\text{EM}}$  de 522 nm; un capilar de sílice fundida (Trajan Scientific, Australia) de 60 cm, con un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ . En su primer uso, el capilar se acondicionó mediante una descarga a una presión de 30 psi con metanol (8 min), 1 M de NaOH (15 min) y agua helix (15 min). Entre carreras, el capilar se descargó a una presión de 20 psi con metanol al 50% (3 min), 0,5 M de NaOH (3 min), agua helix (2 min) y tampón de carrera (5 min). Las muestras se inyectaron a una presión de 0,5 psi durante 17 s en el ánodo, dándose la detección en el cátodo. El voltaje aplicado fue de 21 kV y la corriente observada a esas condiciones fue alrededor de 70  $\mu\text{A}$ . Cada cinco viales, el tampón se refrescaba para mantener perfiles repetitivos. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a  $7 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **3.13. Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticas de los efectos individuales del peso corporal y de los tejidos periféricos, los parámetros plasmáticos, la prueba del laberinto en Y (grupo 1), los niveles de expresión de genes y proteínas y el análisis de los niveles de aminoácidos se evaluaron mediante el análisis de la varianza de una vía (1-ANOVA). Se utilizó el análisis de la varianza de dos vías (2-ANOVA) para detectar diferencias en la ingesta de alimentos y en los datos obtenidos en la prueba del laberinto en Y (grupo 2). En ambos casos, tras el análisis de la varianza se realizó un análisis post-hoc de Bonferroni. Los resultados de los experimentos de electrofisiología se evaluaron mediante ANOVA de una o dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni. Cuando se indicó, se utilizó la prueba *t* de *Student* para comparaciones de medias.

Todos los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media aritmética (media  $\pm$  EEM). Un valor de  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Los valores atípicos se identificaron mediante el método ROUT (Q = 1%). El programa utilizado para el análisis estadístico fue GraphPad Prism, versión 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

## RESULTADOS





## 4. RESULTADOS

---

Los primeros experimentos se diseñaron con el fin de conocer el efecto de las dietas con TB sobre la memoria espacial en ratones *naïve*, utilizando el protocolo de la alternancia espontánea en el laberinto en Y. Las dietas se suministraron de forma crónica (20 semanas) y aguda (48 horas). Tras el ensayo de memoria espacial, se obtuvieron las muestras de cerebro y tejido adiposo para estudiar los posibles cambios en la bioquímica plasmática y la expresión de genes y proteínas implicados en la transmisión glutamatérgica y el metabolismo. Debido a que la TB no ejercía ningún efecto sobre la memoria espacial en animales sin deterioro cognitivo previo, se diseñó un nuevo experimento para valorar el efecto de esta molécula en un modelo de deterioro cognitivo inducido por escopolamina.

Sobre la base de los resultados obtenidos se decidió investigar el efecto *in vitro* de la TB sobre la transmisión y plasticidad sináptica del hipocampo. Además, se estudió el efecto de TB sobre la plasticidad sináptica de animales que previamente habían sido tratados con dietas grasas saturadas e insaturadas.

Los resultados obtenidos muestran que la ingesta de una dieta con un 1% de TB durante 48 h inhibe el deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo inducido por escopolamina en ratones adolescentes. Además, el tratamiento con TB aumenta la expresión génica de *Pparg* y de la mayoría de las subunidades de los receptores de Glu AMPA y NMDA en el hipocampo de los animales adolescentes. Además, hemos demostrado que la TB modula la plasticidad sináptica hipocampal, transformando la *e*-LTP en *-*LTP, en un proceso que depende de PPAR $\gamma$  y AMPK. Finalmente, hemos observado que la TB *in vitro* revierte el deterioro de la LTP inducido por moléculas como la escopolamina o la anandamida, así como el que se induce por el consumo de dietas ricas en grasas saturadas.

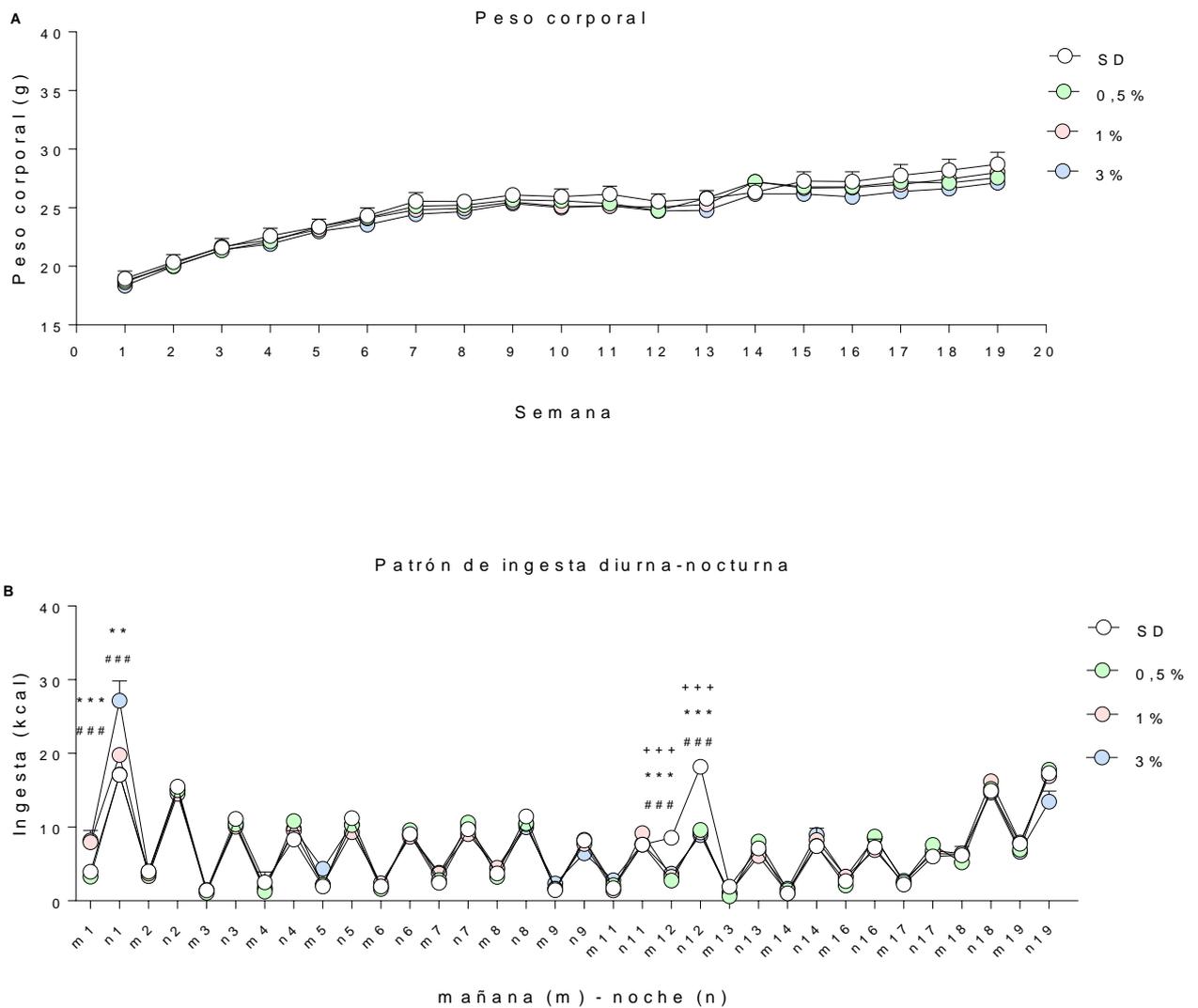
## **4.1. Efecto del consumo de TB durante 20 semanas sobre la memoria espacial dependiente del hipocampo**

En estos experimentos se valoró el consumo crónico de una dieta enriquecida con diferentes concentraciones de TB durante 20 semanas en ratones macho adolescentes (5 semanas de edad). Se utilizaron cuatro grupos de animales: el grupo control (SD), cuya dieta estaba compuesta 100% por dieta estándar de roedor, y tres grupos a los que se les suministraron dietas que contenían 0,5%, 1% o 3% de TB. En estos animales se controló el peso corporal y la ingesta durante las 20 semanas de tratamiento. Una vez finalizado el tratamiento dietético, se valoró la memoria espacial en el laberinto en Y. Posteriormente, se analizó la bioquímica plasmática y se estudió la expresión de genes implicados en la transmisión glutamatérgica y el metabolismo.

### **4.1.1. Peso corporal e ingesta calórica**

El peso corporal de los animales (g), controlado una vez por semana, incrementó de forma similar a lo largo del tiempo en todos los grupos experimentales (SD, 0,5%, 1% y 3%; n=7/grupo) (Figura 16A).

En cuanto al patrón de ingesta día-noche (Figura 16B), se observó que en los 4 grupos experimentales (grupo control (SD) y grupos de dieta con TB (0,5%, 1% y 3%); n=7/grupo), los animales ingerían más kcal durante la fase nocturna (n; noche) que durante la diurna (m; mañana) durante todas las semanas de tratamiento. En la primera semana de tratamiento, se observó que los grupos que tenían acceso a las dietas con TB (1% y 3%) presentaban una mayor ingesta que los controles tanto en la fase nocturna como en la diurna (m1 y n1), siendo más pronunciado durante la fase nocturna (n1). Este efecto desapareció en la segunda semana de acceso a las dietas y no volvió a aparecer en el resto del tiempo de experimentación.



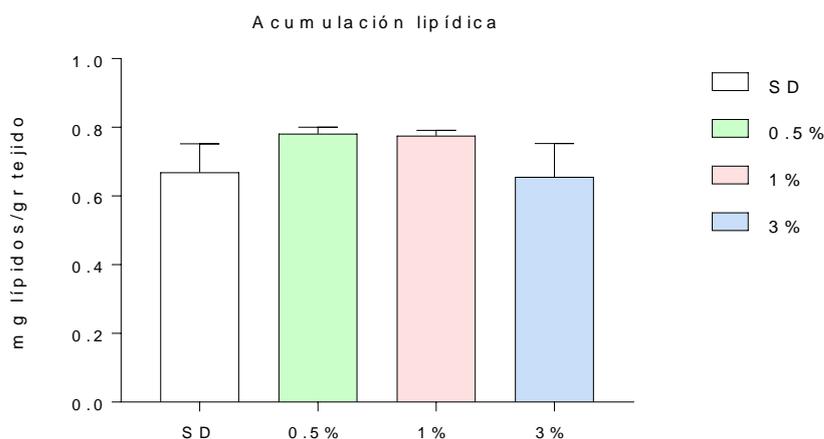
**Figura 16. Peso corporal e ingesta calórica tras las dietas con TB durante 20 semanas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del peso corporal de los animales en g (A) y de las kcal ingeridas (B) en los grupos estudiados (grupo 1: SD, blanco; 0,5%, verde; 1%, rosa; 3%, azul;  $n=7$ /grupo). En la gráfica B se representa la ingesta diurna (m1-m19) así como la ingesta nocturna (n1-n19) a lo largo de las 20 semanas de tratamiento. 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni;  $+++P<0,001$  0,5% vs. SD;  $**P<0,01$  1% vs. SD;  $***P<0,001$  1% vs. SD;  $###P<0,001$  3% vs. SD.

Además del peso corporal (Figura 16A), se cuantificó el peso de los tejidos adiposos, corazón e hígado. Como se detalla en la Tabla 8, el consumo de las dietas con TB durante 20 semanas no produjo cambios significativos en el peso de los tejidos (mg).

**Tabla 8. Peso de los tejidos extraídos tras las dietas con TB durante 20 semanas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM ( $n=7$ /grupo) del peso de los tejidos (mg) en los cuatro grupos estudiados (grupo 1: SD, 0,5%, 1%, 3%). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni.

	SD	0,5%	1%	3%
<b>TAS (mg)</b>	17,3 $\pm$ 1,0	16,6 $\pm$ 1,1	16,5 $\pm$ 1,3	14,1 $\pm$ 0,9
<b>TAL (mg)</b>	6,5 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 0,6
<b>TAE (mg)</b>	22,9 $\pm$ 1,6	21,4 $\pm$ 1,2	21,2 $\pm$ 2,1	18,7 $\pm$ 1,5
<b>Corazón (mg)</b>	5,3 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,4
<b>Hígado (mg)</b>	38,8 $\pm$ 1,9	40,3 $\pm$ 0,9	43,3 $\pm$ 1,5	41,1 $\pm$ 2,9

También se cuantificó la concentración de lípidos en el TAS (g). Como muestra la Figura 17, no encontramos diferencias significativas en el contenido lipídico entre los grupos.



**Figura 17. Determinación de lípidos en el TAS tras las dietas con TB durante 20 semanas.** La figura representa la media  $\pm$  EEM de la relación de lípidos presentes en el tejido adiposo (mg) en función del peso total del tejido (g) en los tres grupos estudiados (grupo 1: SD, blanco; 0,5%, verde; 1%, rosa; 3%, azul;  $n=7$ /grupo). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni.

### 4.1.2. Bioquímica plasmática

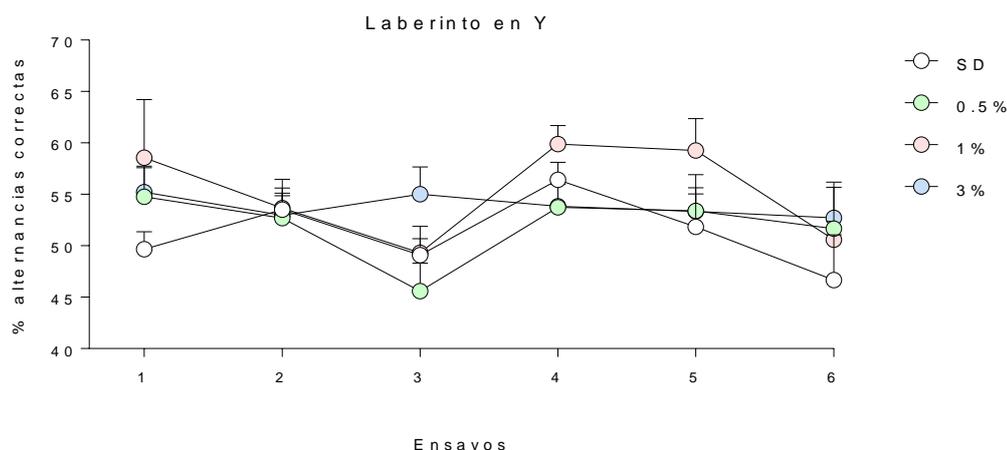
Nuestros resultados muestran que la ingesta de las dietas con TB no produce cambios en los parámetros bioquímicos (Tabla 9).

**Tabla 9. Parámetros bioquímicos plasmáticos tras las dietas con TB durante 20 semanas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM de la concentración plasmática en los cuatro grupos estudiados (grupo 1: SD, 0,5%, 1%, 3%; n=7/grupo) para glucosa, colesterol, triglicéridos, NEFA, leptina, adiponectina e insulina. 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni.

	SD	0,5%	1%	3%
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	156,9 $\pm$ 13,0	120,5 $\pm$ 20,1	162,0 $\pm$ 6,4	138,6 $\pm$ 13,0
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	106,0 $\pm$ 12,0	109,4 $\pm$ 6,7	116,0 $\pm$ 4,7	98,9 $\pm$ 9,8
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	128,8 $\pm$ 16,2	146, 5 $\pm$ 24,5	202,3 $\pm$ 57,6	253,6 $\pm$ 101,5
<b>NEFA (mg/dL)</b>	27,9 $\pm$ 0,8	28,6 $\pm$ 2,2	29,5 $\pm$ 3,6	34,2 $\pm$ 7,6
<b>Leptina (ng/mL)</b>	2,7 $\pm$ 0,6	4,4 $\pm$ 2,2	4,6 $\pm$ 1,7	4,4 $\pm$ 1,1
<b>Adiponectina (mg/mL)</b>	4,0 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4
<b>Insulina (ng/mL)</b>	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1

### 4.1.3. Alternancia espontánea en el laberinto en Y

Se estudió la memoria espacial en el laberinto en Y a través de la valoración del porcentaje de alternancias correctas. Este protocolo se llevó a cabo a lo largo del tratamiento de 20 semanas con las dietas (SD, 0,5%, 1% y 3%; n=7/grupo) y se realizó en 6 ensayos diferentes (ensayos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 llevados a cabo durante las semanas de tratamiento dietético 9, 11, 13, 15, 17 y 19 respectivamente). Observamos que las dietas con TB no producían cambios significativos en este parámetro en ninguno de los ensayos estudiados (Figura 18), aunque parecía existir una tendencia a la mejoría del porcentaje de alternancias en el grupo que consumió la dieta con 1% de TB en los ensayos 4 y 5 (correspondientes a las semanas de tratamiento 15 y 17 respectivamente).



**Figura 18. Alternancia espontánea durante y tras las dietas con TB durante 20 semanas.** La figura representa la media  $\pm$  EEM del % de alternancias correctas en los cuatro grupos estudiados (grupo 1: SD, blanco; 0,5%, verde; 1%, rosa; 3%, azul;  $n=7$ /grupo). Los ensayos corresponden a los diferentes tiempos de tratamiento (sesión 1: 9 semanas; sesión 2: 11 semanas; sesión 3: 13 semanas; sesión 4: 15 semanas; sesión 5: 17 semanas; sesión 6: 19 semanas). 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni.

#### 4.1.4. Expresión génica en el hipocampo, la corteza prefrontal y el tejido adiposo

Tras la realización de los experimentos anteriores, se extrajo el hipocampo y la CPF de los animales para cuantificar la expresión génica de diferentes subunidades de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA, así como de los transportadores de Glu (GLAST, GLT-1) y glucosa (GLUT-1). Se seleccionaron estos receptores por su implicación en los procesos de memoria y en la plasticidad sináptica. Además, se han estudiado diferentes receptores implicados en metabolismo, como el receptor de insulina, leptina, adiponectina y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\alpha/\gamma$ ). Estos últimos, y en particular PPAR $\gamma$ , interviene en el efecto neuroprotector del AB. Por último, se ha estudiado la expresión génica del receptor de ácidos grasos libres en el cerebro (FFAR3).

Nuestros resultados muestran que la ingesta de las dietas con TB no produjo cambios en los niveles de expresión de la mayoría de los genes que se valoraron, ni en el hipocampo, ni en la CPF (Tabla 10). Solamente

se detectó un aumento de la expresión de *Ffar3* en los animales que consumieron la dieta con 3% de TB ( $F_{(3, 22)}=4,238$ ,  $P<0,05$ ) y una regulación a la baja en el caso del receptor de adiponectina de tipo 2 (*Adipor2*) con la dieta que contenía 0,5% de TB ( $F_{(3, 24)}=6,091$ ,  $P<0,005$ ).

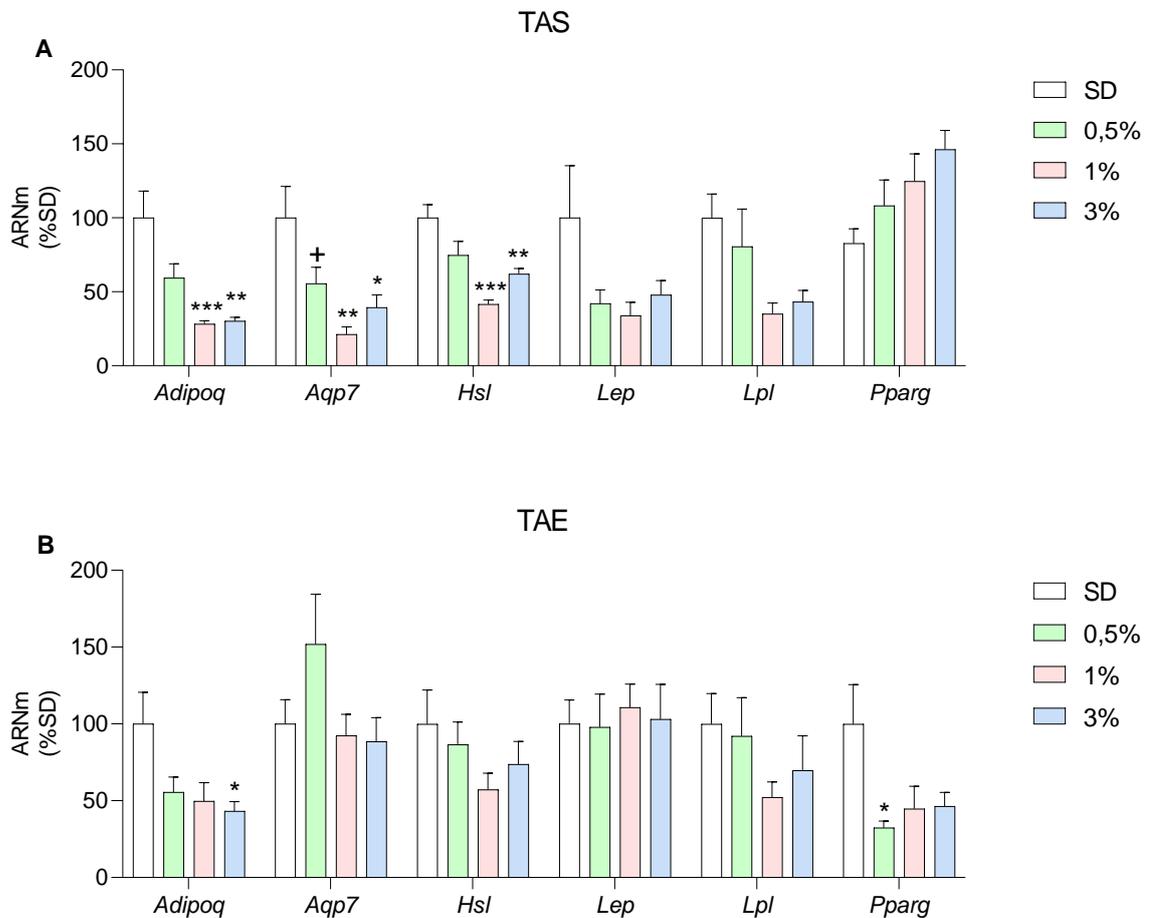
**Tabla 10. Expresión génica en el hipocampo y la CPF tras las dietas con TB durante 20 semanas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del % ARNm en los cuatro grupos estudiados (grupo 1; SD, 0,5%, 1%, 3%;  $n=7$ /grupo). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni; \* $P<0,05$  SD vs. 3%; \*\* $P<0,01$  0,5% vs. 1%/3%; ns: no significativo.

GEN	Hipocampo		Corteza prefrontal	
	$F_{(DFn, DFd)}$	<i>P</i>	$F_{(DFn, DFd)}$	<i>P</i>
<i>Gria1</i>	$F_{(3, 24)} = 2,6$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,1$	ns
<i>Gria2</i>	$F_{(3, 24)} = 1,5$	ns	$F_{(3, 23)} = 0,8$	ns
<i>Grin1</i>	$F_{(3, 24)} = 0,6$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,2$	ns
<i>Grin2A</i>	$F_{(3, 24)} = 1,0$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,4$	ns
<i>Grin2B</i>	$F_{(3, 24)} = 0,6$	ns	$F_{(3, 23)} = 1,7$	ns
<i>Slc1a2</i>	$F_{(3, 24)} = 2,0$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,004$	ns
<i>Slc2a1</i>	$F_{(3, 24)} = 0,9$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,2$	ns
<i>Slc1a3</i>	$F_{(3, 24)} = 1,9$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,6$	ns
<i>Insr</i>	$F_{(3, 23)} = 1,6$	ns	$F_{(3, 24)} = 1,9$	ns
<i>Lepr</i>	$F_{(3, 24)} = 1,4$	ns	$F_{(3, 24)} = 3,1$	ns
<i>Adipor1</i>	$F_{(3, 22)} = 0,1$	ns	$F_{(3, 24)} = 2,2$	ns
<i>Adipor2</i>	$F_{(3, 24)} = 6,0$	<b><math>P=0,003^{**}</math></b>	$F_{(3, 24)} = 0,1$	ns
<i>Ffar3</i>	$F_{(3, 22)} = 4,2$	<b><math>P=0,02^*</math></b>	$F_{(3, 20)} = 0,4$	ns
<i>Ppara</i>	$F_{(3, 24)} = 1,7$	ns	$F_{(3, 24)} = 1,6$	ns
<i>Pparg</i>	$F_{(3, 24)} = 1,5$	ns	$F_{(3, 24)} = 0,7$	ns

Por otro lado, se utilizó el TAS y el TAE de estos animales (grupo 1) para estudiar la expresión de diferentes genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y triglicéridos en el tejido adiposo. (Figura 19). Estos fueron *adiponectina (Adipoq)*, *acuaporina 7 (Aqp7)*, *lipasa sensible a hormonas (Hsl)*, *leptina (Lep)*, *lipoproteína lipasa (Lpl)* y *Pparg*.

Nuestros resultados muestran que la ingesta de las dietas con TB alteraron los niveles de expresión de ARNm de varios de los genes

valorados en el tejido adiposo, disminuyendo significativamente el nivel de expresión de *Adipoq* ( $F_{(3, 23)}=9,8$ ,  $P<0,001$ ), *Aqp7* ( $F_{(3, 23)}=6,6$ ,  $P<0,01$ ) y *Hsl* ( $F_{(3, 23)}=12,5$ ,  $P<0,001$ ) en el TAS (Figura 19A) y de *Adipoq* ( $F_{(3, 24)}=3,8$ ,  $P<0,05$ ) y *Pparg* ( $F_{(3, 24)}=3,7$ ,  $P<0,05$ ) en el TAE (Figura 19B). Sin embargo, mientras que el nivel de expresión de *Pparg* está disminuido significativamente en el TAE (Figura 19B), muestra una tendencia dosis-dependiente al aumento de expresión en el TAS (Figura 19A).



**Figura 19. Expresión génica en el TAS y TAE tras las dietas con TB durante 20 semanas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del % ARNm en el TAS (A) y el TAE (B) en los cuatro grupos estudiados (grupo 1: SD, blanco; 0,5%, verde; 1%, rosa; 3%, azul;  $n=7$ /grupo). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni; \* $P<0,05$  0,5%/1%/3% vs. SD; \*\* $P<0,001$  1%/3% vs. SD; \*\*\* $P<0,005$  1%/3% vs. SD; + $P<0,05$  0,5% vs. 1%.

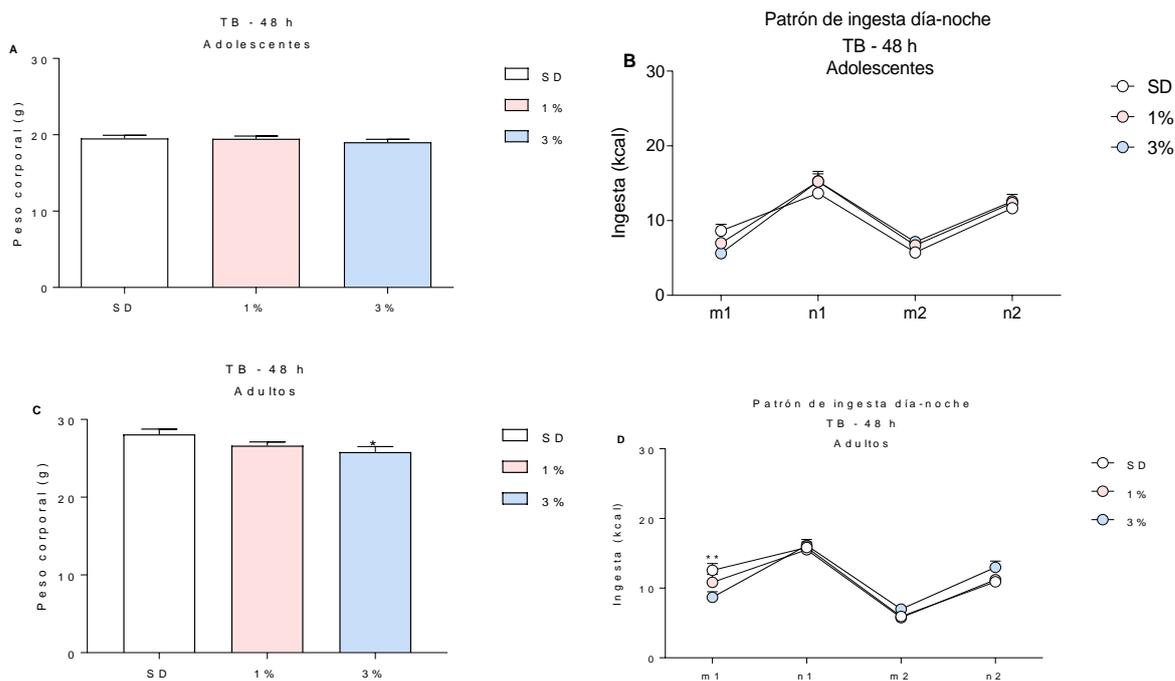
## **4.2. Efecto del consumo de TB durante 48 horas sobre la memoria espacial dependiente del hipocampo**

Debido a que durante el tratamiento crónico el grupo que consumió la dieta con 0,5% de TB presentaba valores muy similares al grupo control, se decidió prescindir de dicho grupo y hacer el estudio con un grupo control (SD) y dos grupos que consumieron dietas con un 1% y un 3% de TB. En estos animales, se controló tanto el peso corporal como la ingesta durante el tratamiento. Una vez finalizado éste, se valoró la memoria espacial en el laberinto en Y. Posteriormente, se realizaron análisis bioquímicos de diferentes parámetros plasmáticos y se estudió la expresión de genes y proteínas implicadas en transmisión glutamatérgica y metabolismo.

### **4.2.1. Peso corporal e ingesta calórica**

La dieta con TB no produjo variaciones en el peso corporal de los animales adolescentes tras 48 h (Figura 20A), sin embargo, en los animales adultos (Figura 20C) la dieta con 3% de TB disminuyó ligeramente el peso corporal en comparación con el grupo control (Figura 20C; 1-ANOVA,  $F_{(2,45)}=3,38$ ,  $P<0,05$ ).

En todos los grupos se observó un patrón de ingesta día (m1, m2; mañana)-noche (n1, n2; noche), pero no encontramos diferencias significativas entre los grupos estudiados ni en animales adolescentes (Figura 20B) ni en animales adultos (Figura 20D), a excepción de la mañana del primer día en el que se observa hiperfagia de los animales adultos que consumieron la dieta SD (Figura 20D).



No obstante, no existen diferencias en la ingesta total (g y kcal) durante las 48 h de tratamiento entre los grupos (Tabla 11). Por lo tanto, la disminución del peso corporal (Figura 20C) en los animales adultos no se debe a los gramos o las kcal ingeridas, sino que es un efecto directo de la dieta con TB.

**Tabla 11. Ingesta total (g y kcal) durante las 48 horas de tratamiento con las dietas de TB en animales adolescentes y adultos.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM (adolescentes: grupos 1 y 2; SD n=22, 1% n=23, 3% n=23; adultos: grupo 2; n=16/grupo) de los gramos y kcal totales ingeridos durante las 48 horas de tratamiento dietético.

	Ingesta (g)			Ingesta (kcal)		
	SD	1%	3%	SD	1%	3%
<b>Adolescentes</b>	3,2 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2	9,9 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,5	10,2 $\pm$ 0,6
<b>Adultos</b>	3,7 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	11,3 $\pm$ 0,6	10,8 $\pm$ 0,6	11,2 $\pm$ 0,6

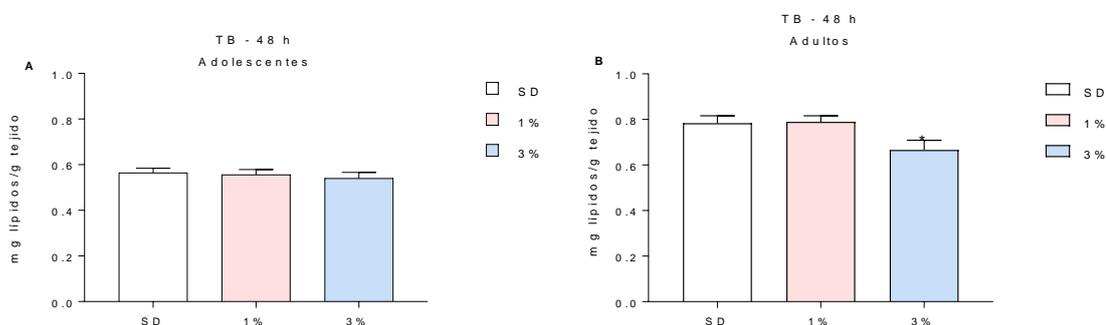
Además del peso corporal, se midió el peso de los tejidos (grupos 1 y 2; TAS, TAL, TAE, corazón e hígado). Nuestros resultados muestran

(Tabla 12) que las dietas con TB no produjeron cambios significativos en el peso de los tejidos de los animales adolescentes; sin embargo, observamos que las dietas con TB redujeron significativamente todos los tejidos adiposos (mg) de los animales adultos (TAS:  $F_{(2, 44)}=5,033$ ,  $P<0,05$ ; TAL:  $F_{(2, 44)}=4,765$ ,  $P<0,05$ ; TAE:  $F_{(2, 43)}=6,2$ ,  $P<0,01$ ).

**Tabla 12. Peso de los tejidos periféricos extraídos tras las dietas con TB durante 48 horas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del peso de los tejidos (mg) en los tres grupos estudiados (adolescentes: grupo 1; SD n=6, 1% n=7, 3% n=7; adultos: grupo 2; n=16/grupo). \* $P<0,05$  vs. SD; \*\* $P<0,01$  vs. SD.

	Adolescentes			Adultos		
	SD	1%	3%	SD	1%	3%
<b>TAS (mg)</b>	9,8 $\pm$ 0,5	10,6 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,3	321,1 $\pm$ 47,3	<b>216,8 <math>\pm</math> 10,9*</b>	<b>203,9 <math>\pm</math> 16,3*</b>
<b>TAL (mg)</b>	1,2 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	157,9 $\pm$ 24,2	<b>99,5 <math>\pm</math> 6,6*</b>	<b>42 <math>\pm</math> 10,5*</b>
<b>TAE (mg)</b>	8,5 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 0,7	637,2 $\pm$ 72,4	<b>460 <math>\pm</math> 25,5*</b>	<b>406 <math>\pm</math> 31,2**</b>
<b>Corazón (mg)</b>	7,1 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,4	174,7 $\pm$ 9,8	160,6 $\pm$ 6,2	151,8 $\pm$ 5,3
<b>Hígado (mg)</b>	52,9 $\pm$ 1,3	56,7 $\pm$ 2,7	59,5 $\pm$ 2,1	1192 $\pm$ 69,5	1128 $\pm$ 26	1194 $\pm$ 34

Se determinó la concentración de lípidos en el TAS extraído tras el tratamiento con TB. Como muestra la Figura 21, no encontramos diferencias significativas entre los grupos en el contenido lipídico de los animales adolescentes (Figura 21A). Sin embargo, en los animales adultos (Figura 21B), los tejidos de los animales que consumieron la dieta con 3% de TB presentaron un contenido lipídico significativamente menor que el resto de grupos ( $F_{(2, 43)}=3,958$ ,  $P<0,05$ ).



**Figura 21. Determinación de lípidos en el TAS tras las dietas con TB durante 48 horas.** La figura representa la media  $\pm$  EEM de la relación de lípidos presentes en el tejido adiposo (mg) en función del peso total del tejido (g) en los tres grupos estudiados (SD, blanco; 1%, rosa; 3%, azul) en animales (A) adolescentes (grupo 1: SD n=6, 1% n=7, 3% n=7) y (B) adultos (grupo 2: n=16/grupo). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni. \* $P<0,05$  vs SD.

#### 4.2.2. Bioquímica plasmática

Nuestros resultados muestran que la ingesta de las dietas con TB no produjo cambios en los parámetros bioquímicos (Tabla 13, grupo 1).

**Tabla 13. Parámetros bioquímicos plasmáticos tras las dietas con TB durante 48 horas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM de la concentración plasmática en los tres grupos estudiados (grupo 1: SD n=6; 1% n=7; 3% n=7) para glucosa, colesterol, triglicéridos, NEFA, leptina, adiponectina e insulina. 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni.

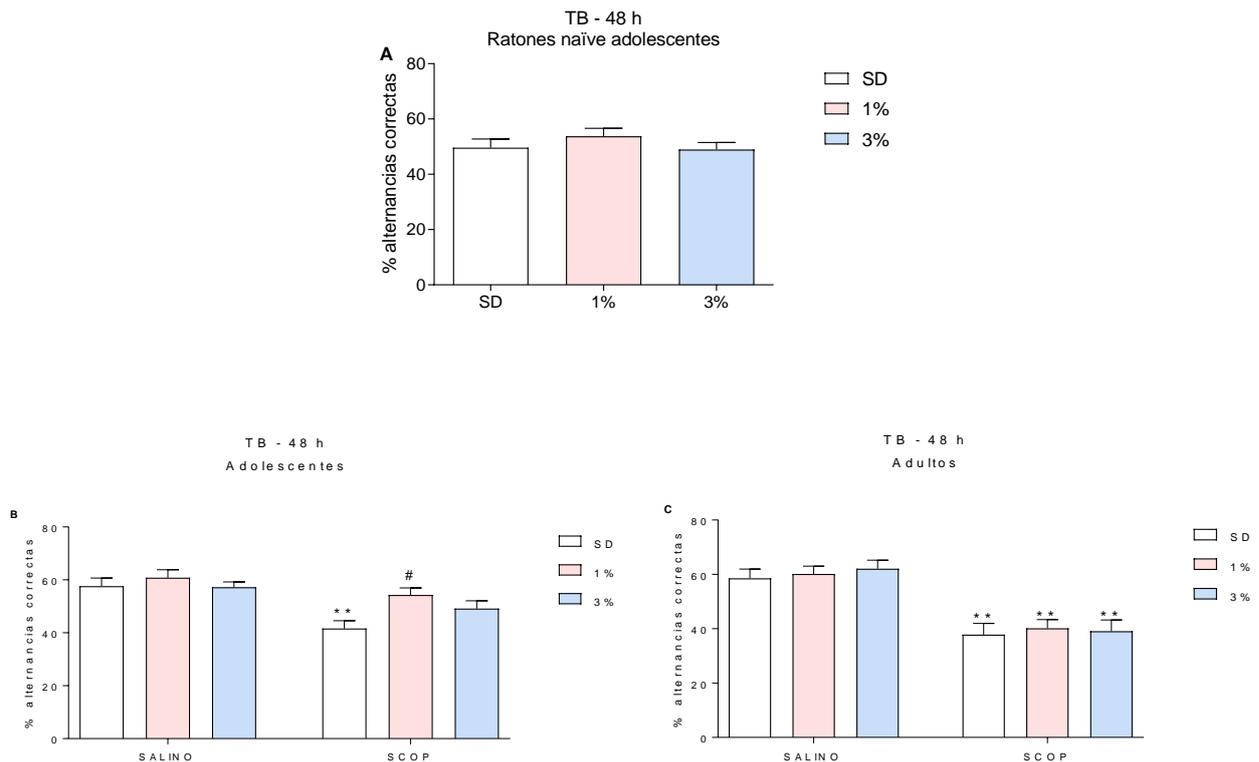
	SD	1%	3%
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	167,9 $\pm$ 24,7	166,6 $\pm$ 11,9	135,6 $\pm$ 22,0
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	117,0 $\pm$ 9,8	111,4 $\pm$ 3,6	116,2 $\pm$ 7,1
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	167,2 $\pm$ 30,5	168,0 $\pm$ 17,1	173,6 $\pm$ 29,3
<b>NEFA (mg/dL)</b>	65,5 $\pm$ 8,4	69,3 $\pm$ 6,9	62,4 $\pm$ 9,0
<b>Leptina (ng/mL)</b>	2,6 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,6
<b>Adiponectina (<math>\mu</math>g/mL)</b>	2,5 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1
<b>Insulina (ng/mL)</b>	0,9 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1

#### 4.2.3. Alternancia espontánea en el laberinto en Y

El efecto agudo de la TB sobre la memoria espacial se evaluó inicialmente en ratones adolescentes *naïve*, es decir, sin previo deterioro cognitivo. Como muestra la Figura 22A, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de alternancias correctas en el laberinto en Y tras las dietas con TB entre los grupos de tratamiento, aunque, al igual que con el tratamiento crónico, la dieta con 1% de TB presenta una tendencia no significativa a un mayor porcentaje de alternancias correctas.

Debido a que este ensayo está diseñado para detectar deterioro en la memoria espacial más que una mejora de los niveles basales, diseñamos un experimento adicional para evaluar el efecto de la TB en un modelo de deterioro de la memoria espacial inducido por escopolamina. El estudio se llevó a cabo en ratones adolescentes (5 semanas) y adultos (11 semanas). Como se ilustra en la Figura 22, la escopolamina redujo el porcentaje de alternancias correctas en el laberinto en Y, tanto en animales adolescentes

(Figura 22B) como en adultos (Figura 22C). Sin embargo, en ratones adolescentes, la TB previno el deterioro de la memoria inducido por escopolamina (Figure 22B; 2-ANOVA, efecto de la escopolamina  $F_{(1, 42)}=20,5$ ,  $P<0,001$ ; efecto de la TB  $F_{(2, 42)}=4,103$ ,  $P<0,05$ ), mientras que este efecto no se observó en los ratones adultos (Figura 22C).



**Figura 22. Alternancia espontánea tras las dietas con TB durante 48 horas.** La figura representa la media  $\pm$  EEM del % de alternancias correctas en los tres grupos estudiados (SD, blanco; 1%, rosa; 3%, azul). **(A)** Animales adolescentes sin previo deterioro cognitivo (grupo 1: SD n=6, 1% n=7, 3% n=7). **(B)** Animales adolescentes con deterioro cognitivo inducido por SCOP (grupo 2: n=8/grupo). **(C)** Animales adultos con deterioro cognitivo inducido por SCOP (grupo 2; n=8/grupo). \*\* $P<0,01$  vs. salino SD/1%/3%; # $P<0,05$  vs. SCOP SD. Post hoc Bonferroni y 2-ANOVA.

#### 4.2.4. Expresión génica y proteica en el hipocampo, la corteza prefrontal y el tejido adiposo

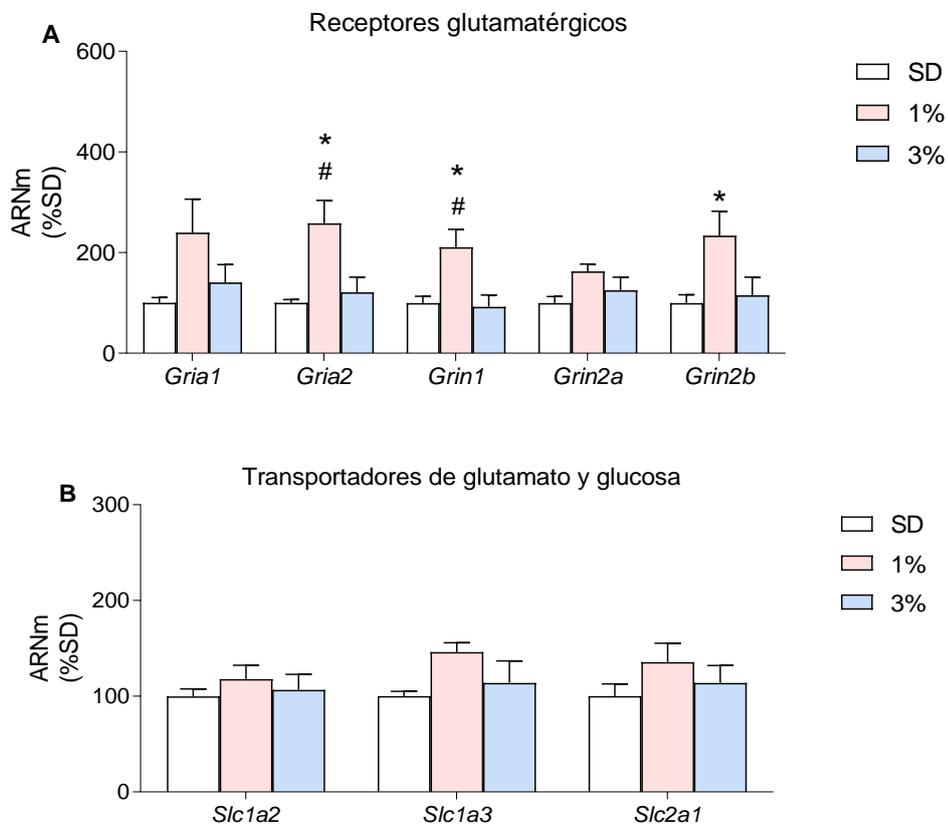
Se analizó la expresión génica de las subunidades de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA y los transportadores de Glu (GLAST, GLT-1) y glucosa (GLUT-1), los receptores implicados en metabolismo como el receptor de insulina, leptina, adiponectina, los receptores  $PPAR_{\alpha/\gamma}$  y

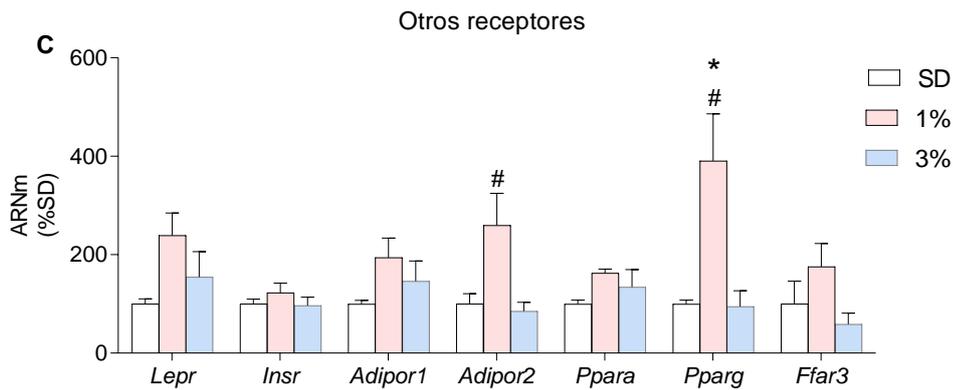
FFAR3. Este estudio se llevó a cabo en muestras de hipocampo y CPF de los animales tratados con las dietas de TB durante 48 horas (grupo 1).

La dieta con 1% de TB aumentó los niveles de ARNm que codifica las diferentes subunidades de AMPA y NMDA (Figura 23A). En concreto, se observó un aumento significativo de la expresión de *Gria2* ( $F_{(2, 17)}=6,733$ ,  $P<0,05$ ), *Grin1* ( $F_{(2, 16)}=6,387$ ,  $P<0,05$ ) y *Grin2b* ( $F_{(2, 17)}=3,847$ ,  $P<0,05$ ) en el hipocampo.

Sin embargo, como muestra la Figura 23B, los datos de expresión génica no mostraron cambios en la cantidad de ARNm de *Slc1a2*, *Slc1a3* y *Slc2a1*, que codifican los transportadores de Glu (GLT-1, GLAST) y glucosa (GLUT-1), respectivamente.

Por último, en cuanto a la expresión génica del resto de receptores estudiados (Figura 23C), se observó un aumento significativo en la expresión de *Adipor2* ( $F_{(2, 16)}=4,984$ ,  $P<0,05$ ) y *Pparg* ( $F_{(2, 15)}=6,619$ ,  $P<0,05$ ), en los animales que consumieron la dieta con 1% de TB.





**Figura 23. Expresión génica en el hipocampo tras las dietas con TB durante 48 horas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del % ARNm de las subunidades de los receptores de glutamato AMPA y NMDA (**A**), de los transportadores de Glu y glucosa (**B**) y de otros receptores como *Lepr*, *Insr*, *Adipor1*, *Adipor2*, *Ppara*, *Pparg* y *Ffar3* (**C**) en los tres grupos estudiados (grupo 1: SD, blanco, n=6; 1%, rosa, n=7; 3%, azul, n=7). 1-ANOVA, post-hoc Bonferroni; \* $P < 0,05$  vs. SD; # $P < 0,05$  vs. 3%.

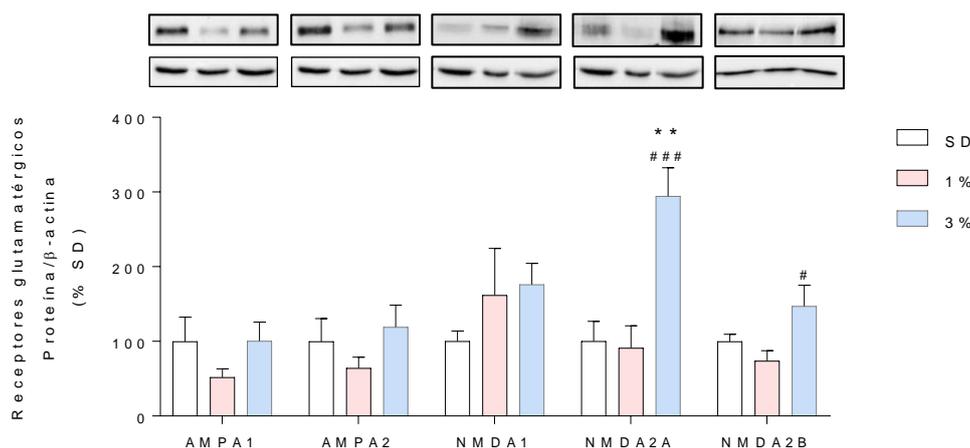
Estos cambios se observaron en el hipocampo, pero no en la CPF (Tabla 14), lo que indica que el efecto de la TB es específico de esta área cerebral.

**Tabla 14. Expresión génica en la CPF tras las dietas con TB durante 48 horas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del % ARNm en los tres grupos estudiados (grupo 1: SD n=6; 1% n=7; 3% n=7). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni; ns: no significativo.

GEN	Corteza prefrontal	
	F <sub>(DFn, DFd)</sub>	P
<b>Gria1</b>	F <sub>(2, 16)</sub> = 1,0	ns
<b>Gria2</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 0,7	ns
<b>Grin1</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 0,5	ns
<b>Grin2A</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 0,5	ns
<b>Grin2B</b>	F <sub>(2, 15)</sub> = 2,2	ns
<b>Slc1a2</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 1,0	ns
<b>Slc2a1</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 3,0	ns
<b>Slc1a3</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 3,6	ns
<b>Insr</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 0,7	ns
<b>Lepr</b>	F <sub>(2, 17)</sub> = 0,7	ns
<b>Adipor1</b>	F <sub>(2, 16)</sub> = 0,6	ns
<b>Adipor2</b>	F <sub>(2, 15)</sub> = 1,1	ns
<b>Ffar3</b>	F <sub>(2, 12)</sub> = 1,4	ns
<b>Ppara</b>	F <sub>(2, 16)</sub> = 1,9	ns
<b>Pparg</b>	F <sub>(2, 16)</sub> = 1,3	ns

A la vista de los resultados de expresión génica en el hipocampo, se estudió la expresión proteica de las subunidades de los receptores de Glu tras el tratamiento agudo con TB en esta área cerebral (Figura 24).

Tanto la subunidad NMDA2A como NMDA2B mostraron un aumento de la expresión en el grupo que ingirió la dieta con 3% de TB frente a los grupos que ingirieron la dieta SD y la dieta con 1% de TB ( $F_{(2, 17)}=12,79$ ,  $P<0,05$ ).



**Figura 24. Expresión proteica de las subunidades de los receptores de glutamato AMPA y NMDA en el hipocampo tras las dietas con TB durante 48 horas.** Las barras muestran la media  $\pm$  EEM de proteína/ $\beta$ -actina en los tres grupos estudiados (grupo 1: SD, blanco, n=6; 1%, rosa, n=7; 3%, azul, n=7) para las subunidades AMPAR1, AMPAR2, NMDAR1, NMDAR2A y NMDA2B. 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni. \*\* $P < 0,01$  vs. SD; # $P < 0,05$  vs. 1%; ### $P < 0,01$  vs. 1%.

Por otro lado, se utilizó el TAS y el TAE de estos animales (grupo 1) para estudiar la expresión de diferentes genes relacionados con el desarrollo de estos tejidos y su carácter endocrino. Estos fueron *Adipoq*, *Aqp7*, *Hsl*, *Lep*, *Lpl* y *Pparg*. Se seleccionaron estos genes debido a su participación en el metabolismo de los ácidos grasos y triglicéridos en el tejido adiposo.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento agudo con las dietas de TB no producía cambios en los niveles de expresión de la mayoría de los genes que se valoraron, ni en el TAS ni en el TAE (Tabla 15), a excepción de *Pparg*, cuya expresión se indujo en el TAE con 3% de TB en comparación con la dieta con 1% de TB ( $F_{(2, 14)}=4,2$   $P < 0,05$ ).

**Tabla 15. Expresión génica en el TAS y el TAE tras las dietas con TB durante 48 horas.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del % ARNm en los tres grupos estudiados (grupo 1: SD n=6; 1% n=7; 3% n=7). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni; \* $P < 0,05$  1% vs. 3%; ns: no significativo.

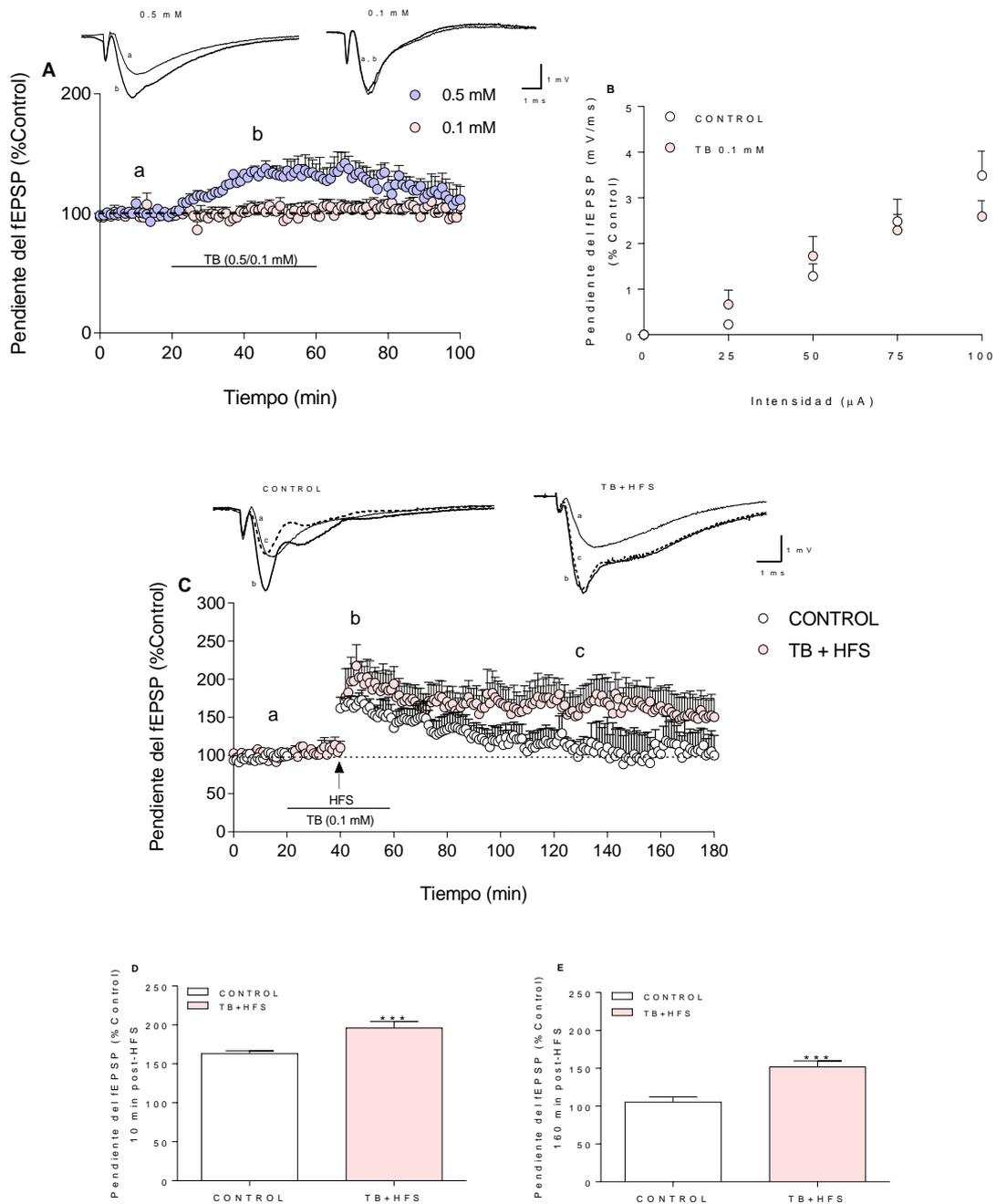
GEN	TAS		TAE	
	$F_{(DFn, DFd)}$	<i>P</i>	$F_{(DFn, DFd)}$	<i>P</i>
<i>Adipoq</i>	$F_{(2, 17)} = 2,2$	ns	$F_{(2, 13)} = 3,1$	ns
<i>Aqp7</i>	$F_{(2, 17)} = 2,3$	ns	$F_{(2, 15)} = 0,6$	ns
<i>Hsl</i>	$F_{(2, 17)} = 1,0$	ns	$F_{(2, 15)} = 3,7$	ns
<i>Lep</i>	$F_{(2, 16)} = 1,3$	ns	$F_{(2, 15)} = 0,4$	ns
<i>Lpl</i>	$F_{(2, 17)} = 1,3$	ns	$F_{(2, 14)} = 3,6$	ns
<i>Pparg</i>	$F_{(2, 17)} = 0,6$	ns	$F_{(2, 14)} = 4,2$	<b><math>P &lt; 0,05^*</math></b>

### 4.3. Efecto de la TB *in vitro* en la plasticidad sináptica

Debido a la influencia de las dietas con TB sobre la memoria, se decidió estudiar mediante registros electrofisiológicos el efecto *in vitro* de la TB sobre la plasticidad y transmisión sináptica hipocampales. Para ello, se valoró la LTP y la transmisión sináptica basal en rodajas de hipocampo de ratones macho adolescentes (5 semanas de edad) *naïve*. Además, estudiamos el efecto *in vitro* de la TB sobre diferentes modelos de deterioro de la LTP, para los cuales, además de animales *naïve*, se utilizaron rodajas de hipocampo de animales tratados con dietas altas en grasas saturadas (SOLF) e insaturadas (UOLF) (grupo 3).

Con el fin de comprobar el efecto de la TB en la transmisión sináptica hipocampal, se hicieron experimentos electrofisiológicos en los que se perfundió TB (0,1 y 0,5 mM) a rodajas de hipocampo de animales *naïve* (Figura 25). Mientras que la TB a una concentración de 0,1 mM no modificó la transmisión sináptica, a una concentración de 0,5 mM potenció la pendiente del fEPSP, lo que provocó un fenómeno similar a la *e*-LTP (Figura 25A). Además, la TB 0,1 mM no alteró la relación estímulo-respuesta, construida mediante la aplicación de estímulos de intensidades crecientes entre 0 y 100  $\mu$ A en el área CA1, comparada con rodajas de ratones control perfundidos únicamente con KRB (Figura 25B). Todos los experimentos siguientes se llevaron a cabo utilizando una concentración de TB de 0,1 mM.

A continuación, se evaluó el efecto de la TB sobre la plasticidad sináptica hipocampal. Como aparece ilustrado en la Figura 25C, la *e*-LTP desencadenada por un solo tren de HFS se convirtió en una *i*-LTP en presencia de TB (0,1 mM). La potenciación del fEPSP inducida por la TB se observó 10 min después de la aplicación del HFS (Figura 25D; Control vs. TB;  $t=4,124$ ,  $P<0,05$ ) y se mantuvo durante al menos 160 min adicionales (Figura 25E; Control vs. TB;  $t=3,964$ ,  $P<0,001$ ).



**Figura 25. Efecto de la TB sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampal.** Los símbolos representan la media de la pendiente inicial del fEPSP (media  $\pm$  EEM) durante el registro en rodajas de hipocampo en el área CA1 (**A**, **C**) perfundidos con TB (**A**) a 0,5 mM ( $n=3$ , morado) y 0,1 mM ( $n=6$ , rosa). (**B**) Curvas estímulo-respuesta (media  $\pm$  EEM del fEPSP vs. intensidad de estimulación aplicada) en rodajas Control ( $n=9$ , blanco) o perfundidas con TB (0,1 mM) ( $n=5$ , rosa). (**C**) Tras 20 min de línea base, se aplicó un único HFS (indicado por una flecha) en rodajas control ( $n=9$ , blanco) o en presencia de TB 0,1 mM ( $n=6$ , rosa). La línea horizontal representa la duración de la perfusión de TB. Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y el registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms (**A** y **C**). (**D**) Comparación de la potenciación de la pendiente del fEPSP 10 min después del HFS y (**E**) 160 min después del HFS en los experimentos representados en **C**. \*\*\* $P < 0,001$  vs. Control; (t de Student, 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni).

Estos resultados demuestran que la TB modula la LTP en el hipocampo. En condiciones normales, un único tren de estimulación de alta frecuencia induce una LTP de corta duración, conocida como e-LTP; en presencia de TB esa estimulación evoca una forma más duradera de la LTP conocida como *I*-LTP.

Debido al hallazgo de este fenómeno, decidimos estudiar las bases moleculares y el mecanismo de acción que podrían estar implicados en el efecto de la TB sobre la transmisión glutamatérgica hipocampal.

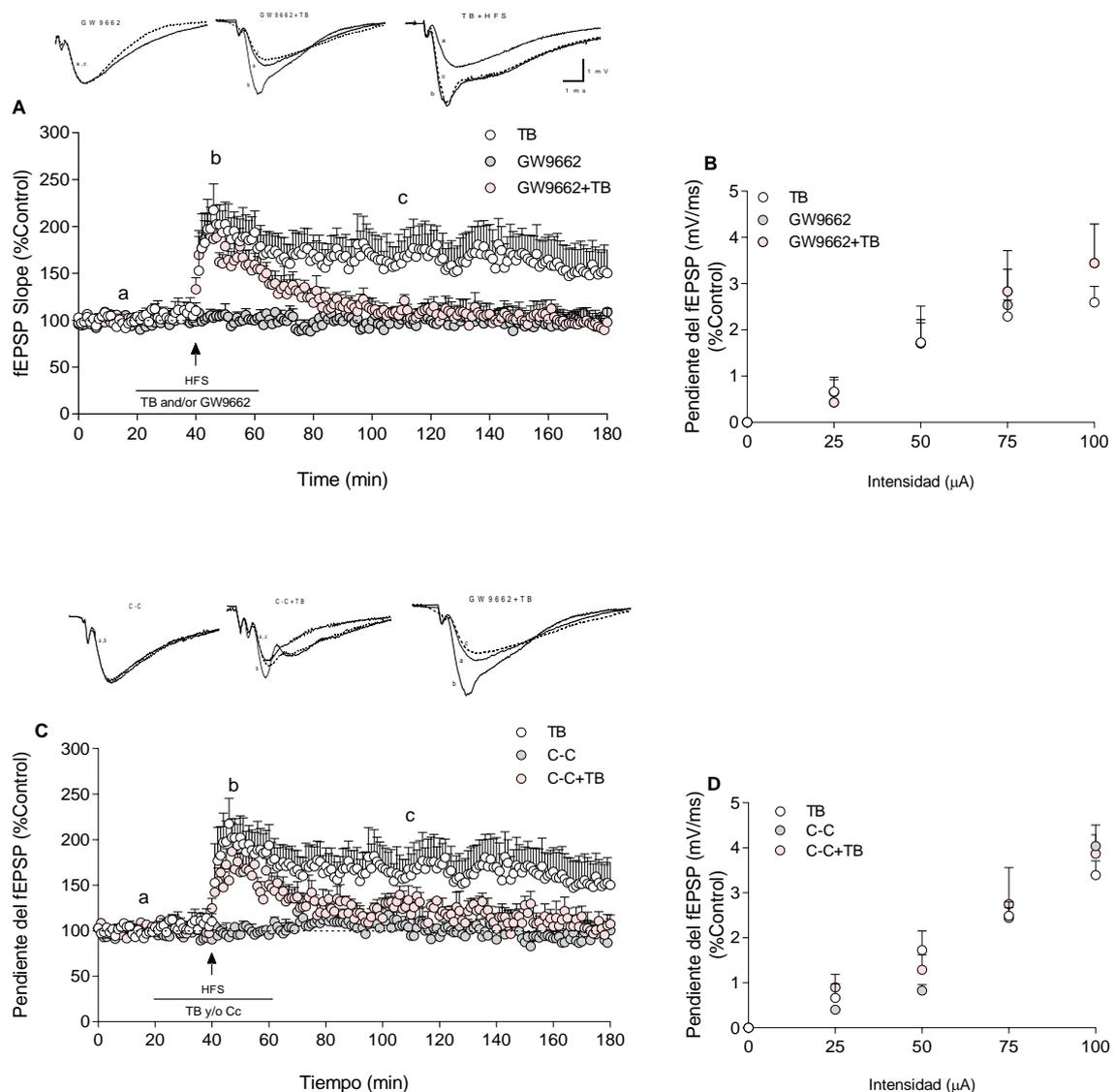
A continuación, la Figura 26, muestra la transmisión sináptica en presencia o ausencia de TB (0,1 mM) en rodajas de hipocampo provenientes de animales *naïve*. Dado que la TB aumentó la expresión de ARNm de *Pparg*, se realizaron registros extracelulares para estudiar el efecto de GW9662 (2  $\mu$ M), antagonista PPAR $\gamma$ , sobre la transmisión sináptica y los cambios en la plasticidad provocados por la TB (Figura 25C). GW9662 disminuyó la facilitación de la *I*-LTP evocada por un solo pulso de HFS en presencia de TB 0,1 mM (Figura 26A; 2-ANOVA;  $F_{(1, 1629)}=359,7$ ,  $P<0,001$ ) sin alterar la transmisión sináptica basal (Figura 26B).

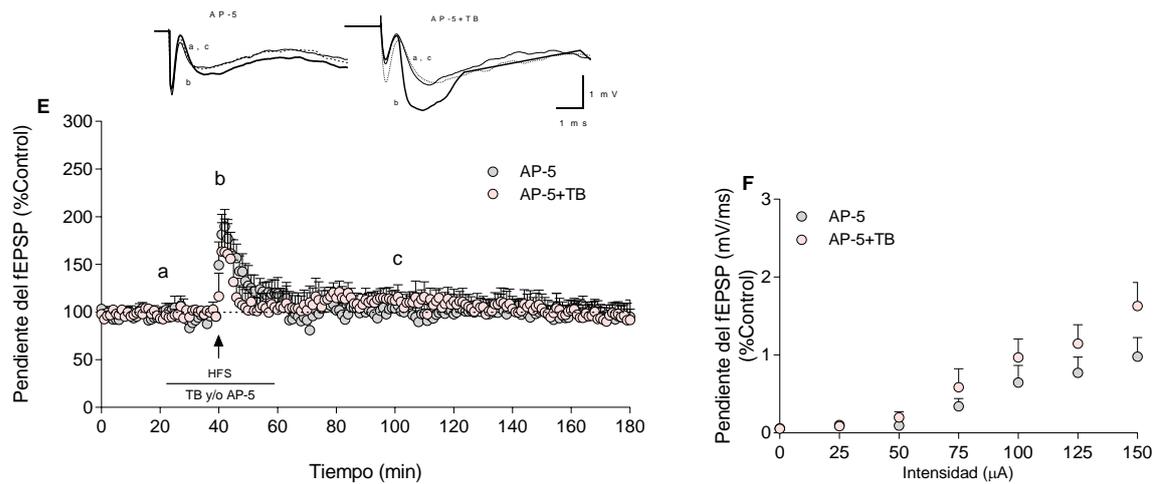
La LTP es un proceso que demanda energía, por ello decidimos explorar la participación de AMPK, sensor del estado de energía celular, en los efectos de la TB. Además, la actividad de AMPK está regulada por PPAR $\gamma$ . Con este objetivo, se probó el efecto del compuesto C (C-C, 5  $\mu$ M), inhibidor de AMPK. Como se ilustra en la Figura 26C, C-C bloqueó el efecto de la TB, disminuyendo la facilitación de la *I*-LTP evocada por un solo pulso de HFS en presencia de TB 0,1 mM (2-ANOVA;  $F_{(1, 1629)}=279,3$ ,  $P<0,001$ ) sin alterar la transmisión sináptica basal (Figura 26D).

Por último, dado que las dietas con TB provocaron la sobreexpresión de las subunidades del receptor de Glu NMDA, se realizaron registros extracelulares para estudiar el efecto de AP-5, un antagonista selectivo del receptor NMDA que inhibe competitivamente el sitio de unión del Glu de los receptores NMDA, sobre la transmisión sináptica y los cambios de plasticidad provocados por la TB (Figura 25C). Nuestros resultados muestran que la LTP de larga duración que se induce por la perfusión de

TB de forma concomitante con un único tren de estimulación de alta frecuencia es dependiente de NMDA y que la inducción del fenómeno no ocurre en presencia de AP-5 (Figura 26E). AP-5 no alteró la transmisión sináptica basal en presencia o ausencia de TB (Figura 26F).

En definitiva, estos resultados nos hacen suponer que la TB podría modular la plasticidad sináptica a través de la activación del receptor  $PPAR\gamma$  y la señalización de este a través de AMPK y que, además, la capacidad de la TB para producir esta modulación de la LTP depende de NMDA.



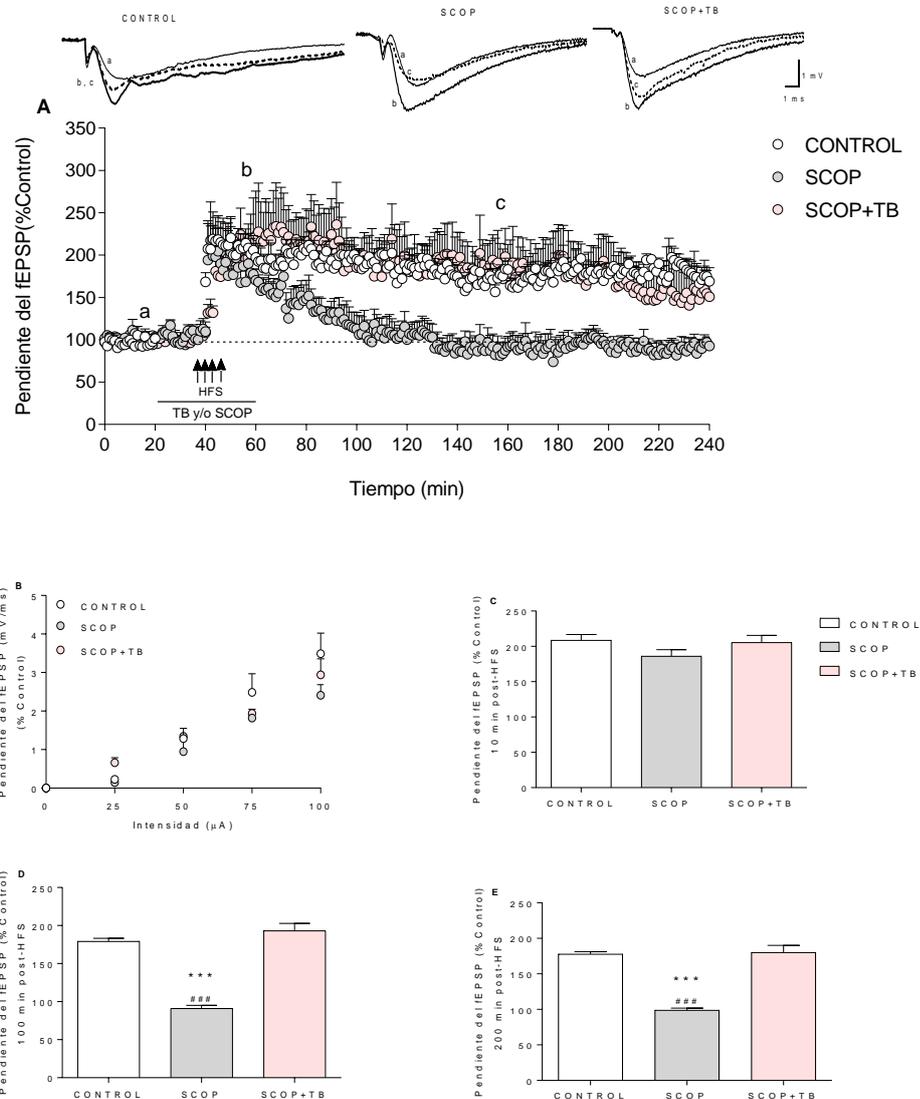


**Figura 26. Efecto de la TB en presencia de inhibidores de PPAR $\gamma$ , AMPK y NMDAR.** Los símbolos representan la media de la pendiente inicial del fEPSP (media  $\pm$  EEM) durante el registro en rodajas de hipocampo en el área CA1 (**A**, **C**, **E**). Tras 20 min de línea base, se aplicó un único HFS (indicado por una flecha) en rodajas perfundidas con TB (0,1 mM) ( $n=6$ , blanco) (**A**, **C**), con GW9662+TB ( $n=5$ , rosa) (**A**), con C-C+TB ( $n=5$ , rosa) (**C**) o con AP-5+TB ( $n=6$ , rosa) (**E**). Curvas estímulo-respuesta (media  $\pm$  EEM del fEPSP vs. intensidad de estimulación aplicada) en rodajas de hipocampo tratadas con TB ( $n=5$ , blanco) (**B**, **D**), GW9662 ( $n=3$ , gris), TB+GW9662 ( $n=6$ , rosa) (**B**), C-C (círculos grises,  $n=2$ ), TB+C-C (círculos rosas,  $n=4$ ) (**D**), AP-5 (círculos grises,  $n=3$ ) y AP-5+TB ( $n=5$ , rosa) (**F**). La línea horizontal representa el tiempo de perfusión de TB y/o GW9662/C-C/AP-5. Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y del registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms. (2-ANOVA y post-hoc Bonferroni).

Hasta el momento, nuestros resultados demuestran que la TB modula la LTP en el hipocampo siendo capaz de convertir una e-LTP en *I*-LTP. Este fenómeno, además de ser dependiente de NMDA podría darse a través de la activación del receptor PPAR $\gamma$  y la señalización de éste a través de AMPK. Para continuar investigando los procesos que subyacen a esta modulación de la LTP, realizamos registros electrofisiológicos en diferentes modelos de deterioro de la LTP, con el fin de estudiar el efecto que la TB ejercía sobre éste.

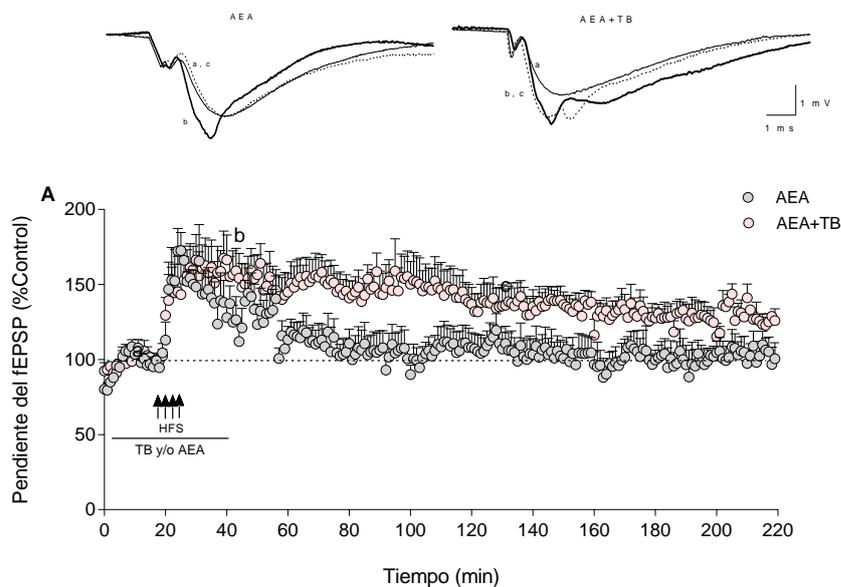
La SCOP es un potente inhibidor de la LTP en el hipocampo (Calabresi y cols., 1999; Sánchez y cols., 2009; Portero-Tresserra y cols., 2014). Por ello, se estudió el efecto de la TB sobre el deterioro de LTP inducido por SCOP, como aparece ilustrado en la Figura 27A. Para ello, se utilizaron rodajas de hipocampo de animales *naïve* que se perfundieron bien con SCOP, o bien con SCOP y TB al mismo tiempo. Como se detalla en la Figura 27B, la SCOP (0,1 mM) no modificó la transmisión sináptica basal ni la inducción de la LTP mediante la administración del HFS (Figura

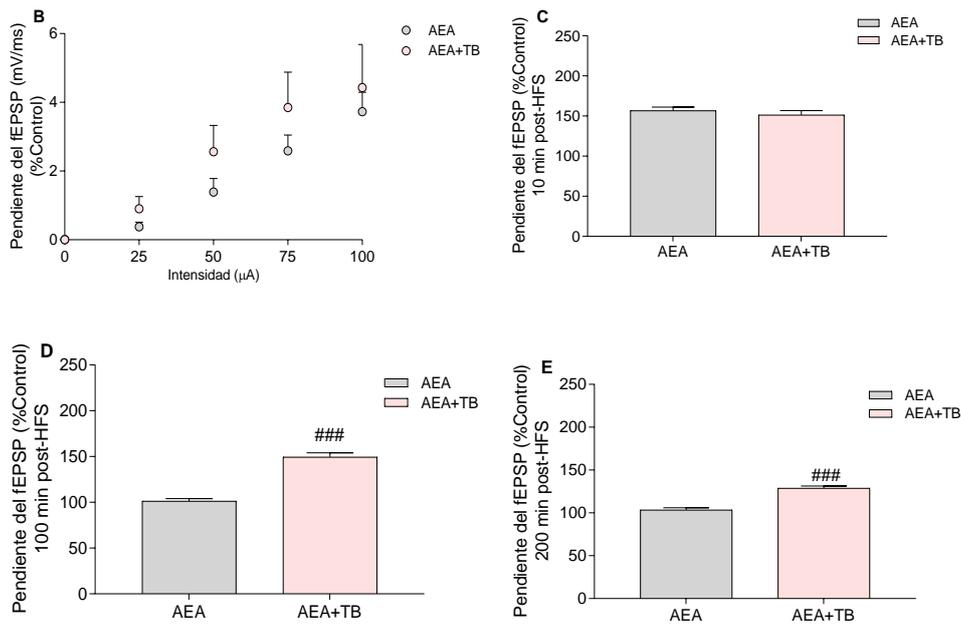
27C), pero abolió por completo el mantenimiento de la LTP, analizado 100 (Figura 27D; 1-ANOVA  $F_{(2, 167)}=63,42$ ,  $P<0,001$ ) y 200 min después de la aplicación del HFS (Figura 27E; 1-ANOVA  $F_{(2, 167)}=46,02$ ,  $P<0,001$ ). Este efecto se revirtió por completo en presencia de TB (0,1 mM) (Figura 27A).



**Figura 27. Efecto de la TB sobre el deterioro de la LTP inducido por SCOP.** (A) Los símbolos representan la media de la pendiente inicial del fEPSP (media  $\pm$  EEM) durante el registro en rodajas de hipocampo en el área CA1. Tras 20 min de línea base, se aplicaron cuatro HFS (indicado por cuatro flechas) a las rodajas control ( $n=6$ , blanco), rodajas perfundidas con SCOP (0,1 mM) ( $n=5$ , gris) y con TB (0,1 mM) + SCOP (0,1 mM) ( $n=6$ , rosa). La línea horizontal representa el tiempo de perfusión de las rodajas por TB y/o SCOP. Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y del registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms. (B) Curvas estímulo-respuesta (media  $\pm$  EEM del fEPSP vs. intensidad de estimulación aplicada) en rodajas Control ( $n=5$ , blanco), SCOP ( $n=3$ , gris) y TB+SCOP ( $n=3$ , rosa). (C) Comparación de la potenciación del fEPSP 10 min, (D) 100 min y (E) 200 min después del HFS. \*\*\* $P<0,001$  vs. CONTROL; #### $P<0,001$  vs. SCOP + TB (1-ANOVA, 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni).

Con el fin de comprobar si la TB era capaz de revertir el deterioro de la LTP inducido por otras moléculas con un mecanismo de acción diferente al de la escopolamina, se realizaron experimentos con AEA ya que la elevación de AEA produce un deterioro de la LTP que afecta a los procesos de aprendizaje y memoria (Basavarajappa y cols., 2014). Así, estudiamos el efecto de la TB sobre el deterioro de LTP inducido por AEA (Figura 28) en rodajas de hipocampo de animales *naïve* que se perfundieron con AEA en presencia o ausencia de TB. Como se detalla en la Figura 28B, la perfusión de AEA (30  $\mu$ M) no modificó la transmisión sináptica basal, pero sin embargo, abolió por completo el mantenimiento de la LTP ya que la potenciación no se mantuvo ni a los 100 (Figura 28D; 1-ANOVA  $F_{(2, 177)}=120,4$ ,  $P<0,001$ ) ni a los 200 min después de la aplicación del HFS (Figura 28E; 1-ANOVA  $F_{(2, 132)}=270,1$ ,  $P<0,001$ ). Este efecto se revirtió completamente en presencia de TB (0,1 mM) (Figura 28A) lo que indica que esta molécula inhibe el deterioro de la LTP inducido por AEA. Por otro lado, se ha demostrado que la AEA afectó también a la inducción de la LTP como se observa en la potenciación 10 min después de la administración del HFS, pero este efecto no se revirtió con TB (Figura 28C).





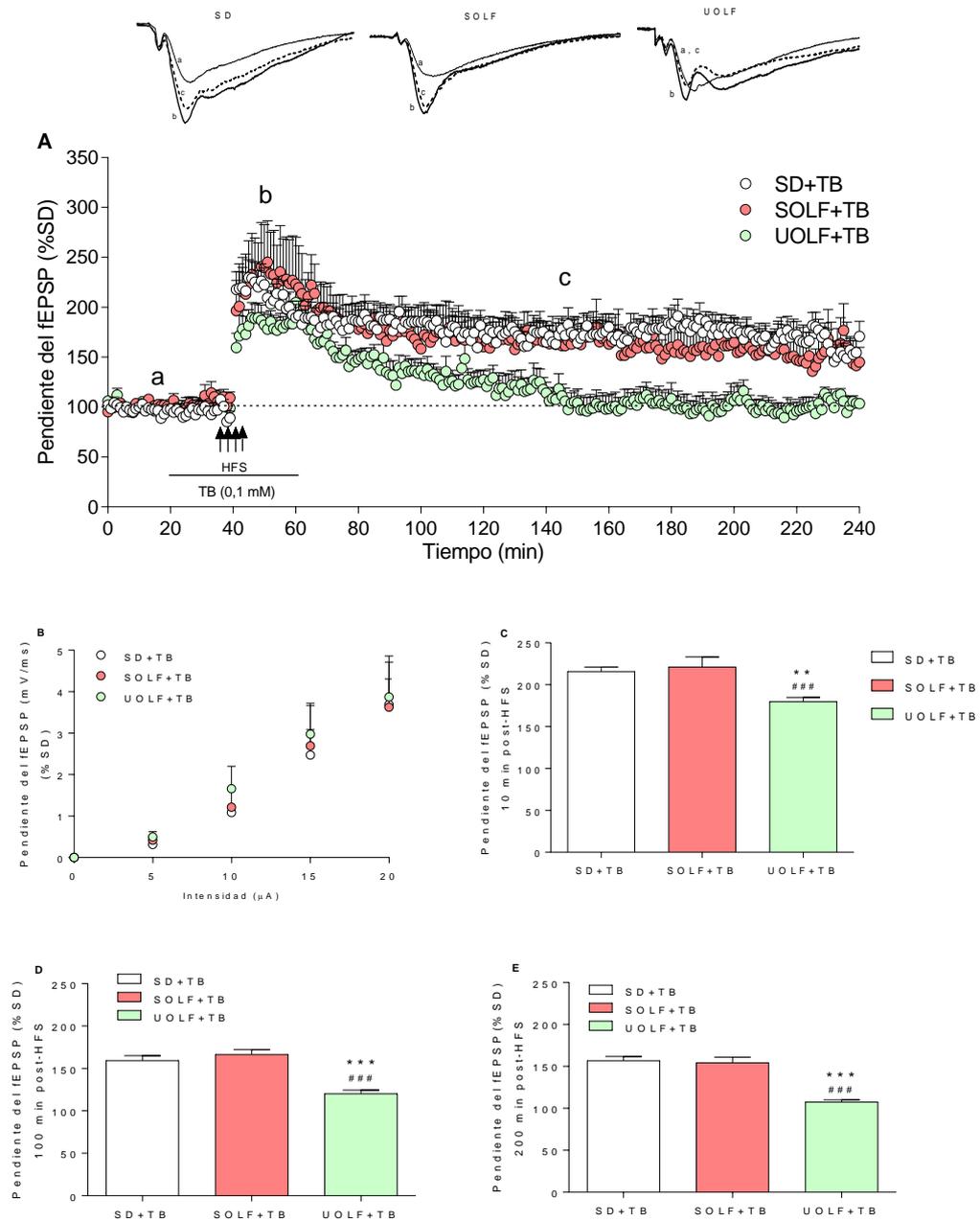
**Figura 28. Efecto de la TB sobre el deterioro de la LTP inducido por AEA.** (A) Los símbolos representan la media  $\pm$  EEM de la pendiente inicial del fEPSP (% respecto al control) de los pulsos administrados en un minuto en el área CA1 del hipocampo durante todo el registro. Tras 20 min de tratamiento con AEA, se aplicaron cuatro HFS (indicado por cuatro flechas) a las rodajas de hipocampo de ratones naïve perfundidas con AEA 30  $\mu$ M ( $n=6$ , gris) y con TB (0,1 mM) + AEA (30  $\mu$ M) ( $n=6$ , rosas). La línea horizontal representa el tiempo de perfusión por TB y/o AEA. Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y del registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms. (B) Curvas de estímulo-respuesta (media  $\pm$  EEM del fEPSP vs. intensidad de estimulación aplicada) en rodajas perfundidas con AEA ( $n=8$ , gris) y TB+AEA ( $n=5$ , rosa). (C) Comparación de la potenciación del fEPSP 10 min, (D) 100 min y (E) 200 min después del HFS. ### $P<0,001$  vs. AEA (1-ANOVA, 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni; estadística realizada utilizando los controles de la Figura 27).

Las dietas HF tienen una gran proporción de ácidos grasos saturados en su composición, que podrían ser los principales responsables de los efectos deletéreos de este tipo de alimentos sobre el aprendizaje y la memoria (Valladolid-Acebes y cols., 2011). En este sentido, nuestros resultados recientes mostraron que las dietas altas en ácidos grasos saturados (SOLF) e insaturados (UOLF) inducían deterioro de la memoria espacial relacionado con cambios en la transmisión sináptica y la plasticidad, mostrando una disminución en la transmisión sináptica basal en el hipocampo y un deterioro muy robusto de los mecanismos de plasticidad sináptica, concretamente de la LTP (Fernández-Felipe y cols., 2021). Por ello, se estudió el efecto de la TB sobre los efectos deletéreos

en la plasticidad sináptica provocado por las dietas SOLF y UOLF con el fin de evidenciar si ésta era capaz de revertir dichos efectos.

En primer lugar, estudiamos el efecto de la TB en rodajas de hipocampo de animales tratados con las dietas SOLF y UOLF durante 8 semanas (grupo 3), los cuales presentaron disminución en la transmisión sináptica y deterioro de la LTP con ambas dietas (Fernández-Felipe y *cols.*, 2021).

Nuestros resultados mostraron que la perfusión de TB (0,1 mM) durante 40 min en las rodajas de animales tratados con las dietas revirtió el deterioro de la LTP inducido por la dieta SOLF, pero no fue capaz de revertir el deterioro de la LTP provocado por la dieta UOLF (Figura 29A; 2-ANOVA  $F_{(2, 19)}=4,469$ ,  $P<0,05$ ). La presencia de TB no modificó la transmisión basal de ninguno de los grupos (Figura 29B). Tampoco inhibió el efecto de la dieta UOLF en la inducción del fenómeno ya que, como se puede observar en la Figura 29C, el nivel de potenciación del fEPSP en los animales tratados con la dieta UOLF fue significativamente menor que los controles 10 min después de la aplicación del tren (Figura 29C; 1-ANOVA  $F_{(2, 187)}=8,781$ ,  $P<0,001$ ). Sin embargo, la presencia de TB permitió que la potenciación del fEPSP de los animales tratados con la dieta SOLF 10 min después del tren fuese idéntica a sus controles (Figura 29C), lo que hace sospechar que la TB revierte el efecto que la dieta SOLF tiene sobre la inducción de la LTP demostrada previamente en nuestro laboratorio (Fernández-Felipe y *cols.*, 2021). El resultado es similar para el mantenimiento del proceso, ya que como se puede observar en las Figuras 29D y 29E, la presencia de TB permite que el nivel de potenciación sea el mismo que en los controles al final del experimento para la dieta SOLF, mientras que no es capaz de revertir la inhibición del proceso que genera la dieta UOLF (Figura 29D; 1-ANOVA  $F_{(2, 187)}=24,54$ ,  $P<0,001$ ; Figura 29E; 1-ANOVA  $F_{(2, 187)}=38,54$ ,  $P<0,001$ ). Esto demuestra que la TB es capaz de revertir el deterioro inducido por la dieta SOLF, pero no el deterioro inducido por la dieta UOLF.



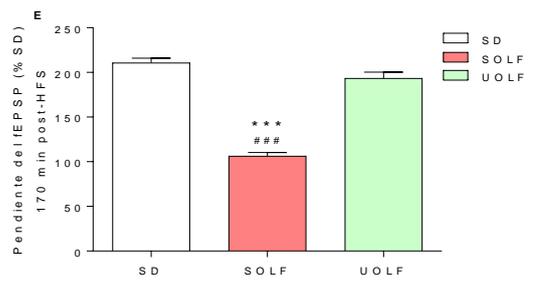
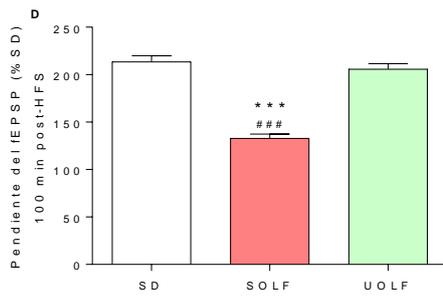
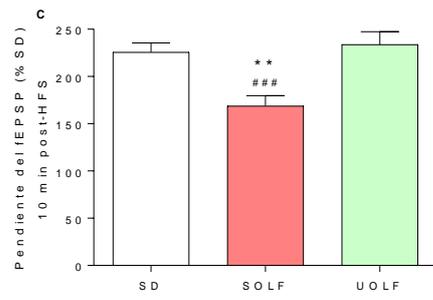
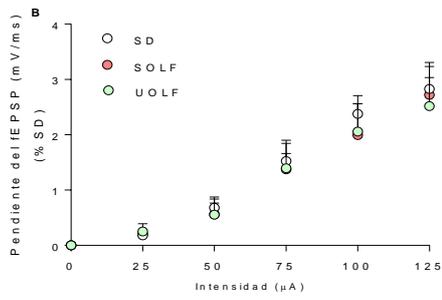
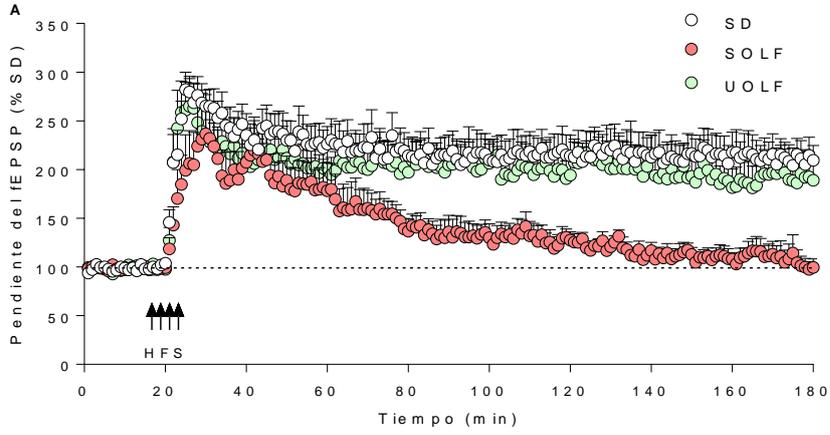
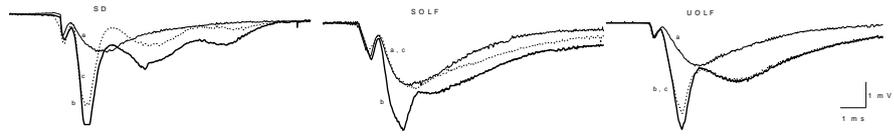
**Figura 29. Efecto de la TB en rodajas de hipocampo de animales tratados con dietas SOLF y UOLF durante 8 semanas. (A)** Los símbolos representan la media  $\pm$  EEM de la pendiente inicial del fEPSP (% respecto al control) de los pulsos administrados en un minuto en el área CA1 del hipocampo durante todo el registro. Tras 20 min de línea base, se aplicaron cuatro HFS (indicado por cuatro flechas) a las rodajas control (SD,  $n=6$ , blanco), SOLF ( $n=6$ , rojo) y UOLF ( $n=7$ , verde). La línea horizontal representa el tiempo de perfusión por TB. Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y del registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms. **(B)** Curvas de estímulo-respuesta (media  $\pm$  EEM del fEPSP vs. intensidad de estimulación aplicada) en rodajas control (SD,  $n=3$ , blanco), SOLF ( $n=3$ , rojo) y UOLF ( $n=5$ , verde). **(C)** Comparación de la potenciación del fEPSP 10 min, **(D)** 100 min y **(E)** 200 min después del HFS. \*\*\* $P < 0,001$  vs. SD; ### $P < 0,001$  vs. SOLF (1-ANOVA, 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni).

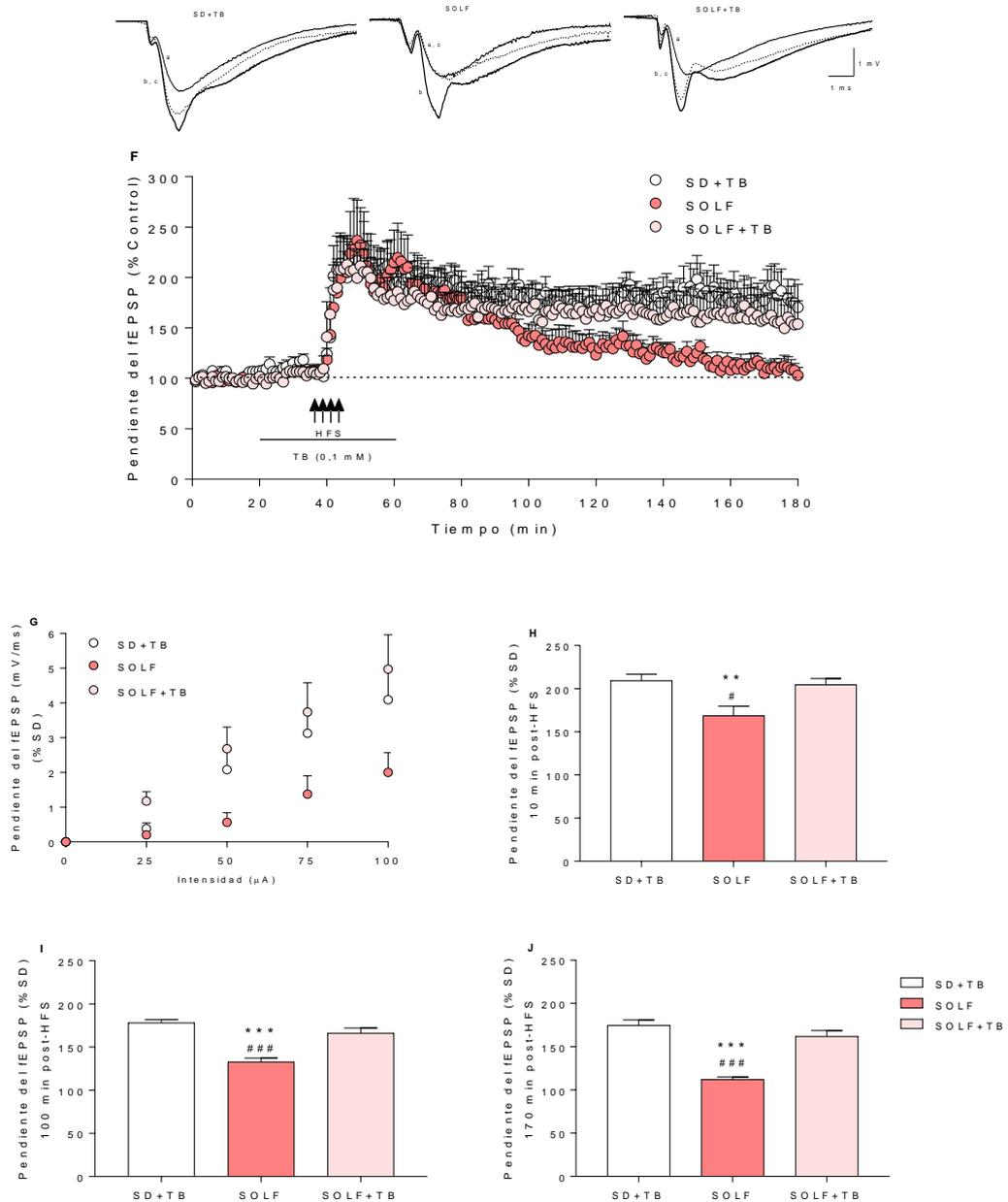
En segundo lugar, tras observar el efecto que la TB ejercía sobre animales tratados crónicamente con las dietas SOLF y UOLF, decidimos estudiar el efecto de la TB sobre rodajas de animales que se sometieron a un tratamiento dietético agudo con estas dietas (grupo 3). Los animales consumieron las dietas SOLF y UOLF durante dos horas, transcurridas las cuales, se realizaron registros de electrofisiología para estudiar, en primer lugar, el efecto de este tratamiento agudo sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampales (Figura 30A) y, en segundo lugar, el efecto de la TB sobre dichos procesos (Figura 30F).

Nuestros resultados mostraron que la dieta UOLF no afectó a la plasticidad sináptica mientras que la dieta SOLF, causó un deterioro muy robusto de la LTP (Figura 30A; 2-ANOVA  $F_{(360, 2715)}=1,262$ ,  $P<0,005$ ), que se observó tanto en la inducción del fenómeno (Figura 30C; 1-ANOVA  $F_{(2, 140)}=10,21$ ,  $P<0,001$ ) como en el mantenimiento del proceso (Figura 30D; 1-ANOVA  $F_{(2, 177)}=66,85$ ,  $P<0,001$ ; Figura 30E; 1-ANOVA  $F_{(2, 177)}=107,2$ ,  $P<0,001$ ).

Así, caracterizamos el efecto del tratamiento agudo con las dietas SOLF y UOLF sobre la plasticidad sináptica hipocampal encontrando, tal y como ocurría con el tratamiento crónico, un deterioro de la LTP causado por la dieta SOLF, por lo que estudiamos el efecto de la TB sobre este deterioro (Figura 30F).

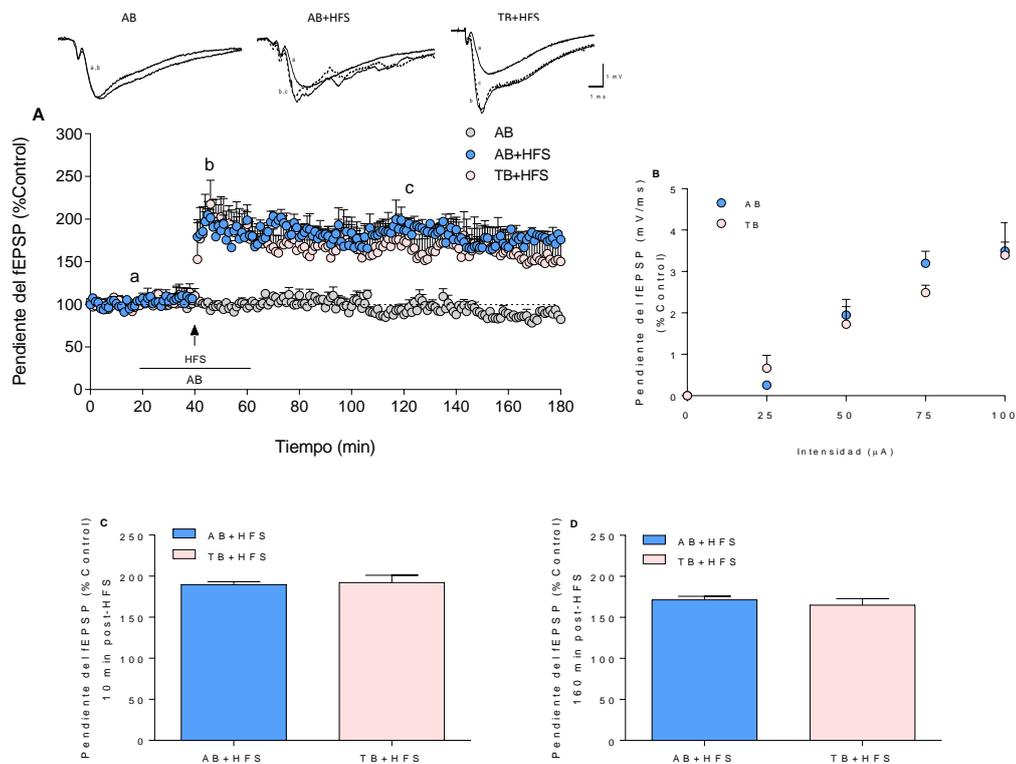
Nuestros resultados mostraron que la perfusión de TB (0,1 mM) durante 40 min en las rodajas de animales tratados con la dieta SOLF revirtió el deterioro de la LTP inducido por esta dieta (Figura 30F), tanto en la inducción de la LTP (Figura 30H; 1-ANOVA  $F_{(2, 182)}=6,713$ ,  $P<0,005$ ) como del mantenimiento de ésta (Figura 30I; 1-ANOVA  $F_{(2, 177)}=22,66$ ,  $P<0,001$ ; Figura 30J; 1-ANOVA  $F_{(2, 187)}=34,74$ ,  $P<0,001$ ).





**Figura 30. Efecto de la TB en rodajas de hipocampo de animales tratados con dietas SOLF y UOLF durante dos horas.** Los símbolos representan la media  $\pm$  EEM de la pendiente inicial del fEPSP (% respecto al SD) durante el registro en el área CA1 del hipocampo (**A**, **F**). Tras 20 min de línea base, se aplicaron cuatro HFS (indicado por cuatro flechas) a las rodajas control (SD,  $n=6$ , blanco), SOLF ( $n=6$ , rojo), UOLF ( $n=6$ , verde) (**A**), SD+TB ( $n=6$ , blanco), SOLF (correspondiente a la Figura 29A;  $n=6$ , rojo) y SOLF+TB ( $n=6$ , rosa). La línea horizontal representa el tiempo de perfusión con TB (**F**). Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y del registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms (**A**, **F**). Curvas de estímulo-respuesta (media  $\pm$  EEM del fEPSP vs. intensidad de estimulación aplicada) en rodajas control (SD,  $n=8$ , blanco), SOLF ( $n=7$ , rojo), UOLF ( $n=7$ , verde) (**B**), SD+TB ( $n=5$ , blanco), SOLF (correspondiente a la Figura 29B;  $n=7$ , rojo) y SOLF+TB ( $n=4$ , rosa) (**G**). Comparación de la potenciación del fEPSP 10 min (**C**, **H**) 100 min y (**D**, **I**) 170 min (**E**, **J**) después del HFS. \*\* $P < 0,01$  vs. SD; \*\*\* $P < 0,001$  vs. SD; # $P < 0,05$  vs. SOLF+TB; ### $P < 0,001$  vs. UOLF/SOLF+TB. (1-ANOVA, 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni).

Dado que la TB es un precursor del AB (Su, Zhang, y Ho, 2004), se llevó a cabo un ensayo de control para estudiar el efecto directo del AB sobre la plasticidad sináptica. Como aparece ilustrado en la Figura 31, el AB (75  $\mu\text{M}$ ) no alteró la pendiente del fEPSP (Figura 31A) ni la transmisión sináptica basal (Figura 31B). Sin embargo, en presencia de AB, una e-LTP desencadenada por un solo pulso de HFS evocó una *I*-LTP (Figura 31A), tal y como se observa en el caso de la TB (Figura 25C). La aplicación de un único tren de alta frecuencia en presencia de AB provocó el mismo efecto que la TB (Figura 25C) tanto en la potenciación del fEPSP (Figura 31C) como en el mantenimiento del fEPSP (Figura 31D).

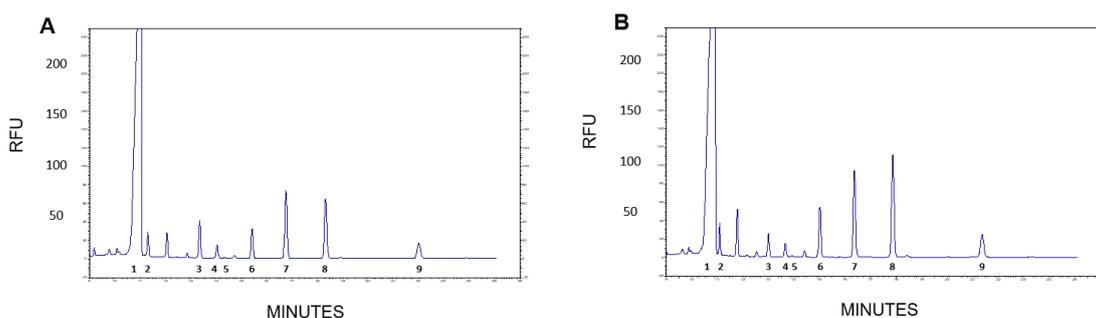


**Figura 31. Efecto del AB sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampal.** (A) Los símbolos representan la media de la pendiente inicial del fEPSP (media  $\pm$  EEM) durante el registro. Tras 20 min de línea base, se perfundieron las rodajas de los animales naïve con AB (75  $\mu\text{M}$ ) ( $n=4$ , gris) y se aplicó un único HFS (indicado por una flecha) para inducir e-LTP en presencia de AB ( $n=5$ , azul). Estos datos fueron comparados con la e-LTP inducida en las rodajas de hipocampo de animales naïve perfundidos con TB (0,1 mM) ( $n=6$ , rosa). La línea horizontal representa la duración de la perfusión de AB/TB. Los trazos superiores son promedios de los fEPSP registrados durante el período basal (a, trazo fino), después del HFS (b, trazo grueso) y del registro final (c, trazo de guiones). Calibración: 1 mV, 1 ms. (B) La gráfica muestra las curvas de estímulo-respuesta para medir la capacidad de respuesta sináptica en rodajas de hipocampo perfundidos con AB ( $n=9$ , azul) y TB ( $n=5$ , rosa). Comparación de la potenciación de la pendiente del fEPSP (C) 10 min y (D) 160 min después del HFS. (*t* de Student, 2-ANOVA y post-hoc Bonferroni).

#### 4.4. Efecto de la TB/AB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica

Con el fin de ahondar en el conocimiento del papel de la TB en la transmisión glutamatérgica hipocampal, estudiamos el efecto de la TB y el AB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica mediante electroforesis capilar inducida por láser.

Se determinaron siete aminoácidos, incluidos GABA, L-glicina (Gly), L-serina (L-Ser), D-serina (D-Ser), taurina (Tau), L-glutamato (Glu) y L-aspartato (Asp) en todas las muestras y los resultados se expresaron en mg de aminoácido por g de proteína total (Figura 32).



**Figura 32. Electroferograma de rodajas de hipocampo incubadas con TB y AB.** Representación de un electroferograma de rodajas de hipocampo incubadas con TB (A) y con AB (B). Identificación de picos: 1-NBD-F (fluoróforo); 2-GABA; 3-Gly; 4-L-Ser; 5-D-Ser; 6-Tau; 7-IS (estándar interno); 8-Glu y 9-Asp.

Nuestros resultados muestran que la TB no modificó los niveles de la mayoría de los aminoácidos hipocampales, pero tenía un claro efecto sobre la D-Ser (Tabla 16) ya que las rodajas tratadas con TB a las cuatro concentraciones utilizadas (30, 75, 150 y 300  $\mu$ M) presentaron una disminución significativa de este aminoácido ( $F_{(4, 26)}=5,791$ ,  $P<0,01$ ), de forma independiente de su precursor, L-Ser, cuyos niveles solo se alteraron a la concentración de 75  $\mu$ M ( $F_{(4, 26)}=3,714$ ,  $P<0,05$ ).

Por otro lado, el AB (Tabla 17) redujo los niveles de GABA ( $F_{(4, 30)}=3,227$ ,  $P<0,05$ ) mientras que elevó los de Glu ( $F_{(4, 31)}=10,03$ ,  $P<0,001$ ) y

Asp ( $F_{(4, 31)}=4,818$ ,  $P<0,01$ ). No aparecieron cambios en los niveles de Gly y Tau. Finalmente, concentraciones bajas de AB disminuyeron L-Ser ( $F_{(4, 30)}=8,537$ ,  $P<0,001$ ), pero este efecto desapareció con concentraciones más altas de AB.

Los niveles de D-Ser, sin embargo, disminuyeron con concentraciones más altas de AB ( $F_{(4, 31)}=4,989$ ,  $P<0,01$ ), por lo que disminuyó el ratio D/L-Ser ( $F_{(4, 30)}=5,166$ ,  $P<0,01$ ). En definitiva, parece que el AB produce una disminución de los aminoácidos inhibitorios mientras que aumenta los aminoácidos excitatorios.

**Tabla 16. Efecto de la TB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del nivel de aminoácidos en las cuatro concentraciones de TB empleadas (30, 75, 150, 300  $\mu$ M;  $n=8$ /grupo). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni; \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  vs. Control. ns: no significativo.

Tributirina					
Aminoácidos (mg/g)	Control	30 $\mu$ M	75 $\mu$ M	150 $\mu$ M	300 $\mu$ M
<b>GABA</b>	2,0 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2
<b>Gly</b>	1,1 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,1
<b>L-Ser</b>	1,9 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1
<b>D-Ser</b>	0,2 $\pm$ 0,02	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,01**</b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,02**</b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,01*</b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,2*</b>
<b>L-Ser/D-Ser</b>	9,1 $\pm$ 1,0	12,1 $\pm$ 1,2	11,0 $\pm$ 1,5	9,7 $\pm$ 1,2	10,3 $\pm$ 1,4
<b>Tau</b>	5,0 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,3
<b>Glu</b>	9,6 $\pm$ 0,7	13,2 $\pm$ 0,7	10,4 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 1,1	12,0 $\pm$ 1,3
<b>Asp</b>	3,6 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,4
<b>Glu/Asp</b>	2,8 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,3

**Tabla 17. Efecto del AB sobre los niveles de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica.** Los datos muestran la media  $\pm$  EEM del nivel de aminoácidos en las cuatro concentraciones de AB empleadas (30, 75, 150, 300  $\mu$ M; n=8/grupo). 1-ANOVA y post-hoc Bonferroni; \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs. Control. #P<0,05; ##P<0,01 vs. 30  $\mu$ M. ns: no significativo.

Ácido butírico					
Aminoácidos (mg/g)	Control	30 $\mu$ M	75 $\mu$ M	150 $\mu$ M	300 $\mu$ M
<b>GABA</b>	2,0 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	<b>1,3 <math>\pm</math> 0,1*</b>	1,4 $\pm$ 0,2	<b>1,3 <math>\pm</math> 0,1*</b>
<b>Gly</b>	1,1 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,08	1 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,07
<b>L-Ser</b>	1,9 $\pm$ 0,1	<b>0,8 <math>\pm</math> 0,1***</b>	1,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
<b>D-Ser</b>	0,2 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,08	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,01#</b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,01#</b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,2##</b>
<b>L-Ser/D-Ser</b>	9,1 $\pm$ 1,03	3,1 $\pm$ 1,1	11,2 $\pm$ 1,8	10,8 $\pm$ 2,8	<b>16,3 <math>\pm</math> 2,9##</b>
<b>Tau</b>	5,0 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,2
<b>Glu</b>	9,6 $\pm$ 0,7	<b>17,5 <math>\pm</math> 1,2***</b>	<b>15,6 <math>\pm</math> 1,8**</b>	13,6 $\pm$ 0,9	<b>10,9 <math>\pm</math> 0,8##</b>
<b>Asp</b>	3,6 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,5	<b>2,9 <math>\pm</math> 0,2#</b>
<b>Glu/Asp</b>	2,8 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,4	<b>3,8 <math>\pm</math> 0,2*</b>

## DISCUSIÓN





## 5. DISCUSIÓN

---

A lo largo de este trabajo se ha descrito el interés que ha adquirido en los últimos años el efecto del AB sobre el SNC y su implicación en determinados procesos cognitivos. Los datos de estudios preclínicos y clínicos han demostrado el potencial de esta molécula para el tratamiento no solo de trastornos gastrointestinales y metabólicos, como la obesidad, sino de una amplia gama de trastornos psiquiátricos y neurológicos, incluida la EP, la EA o la depresión. En la presente Tesis Doctoral hemos investigado el efecto de la tributirina (TB), un precursor de AB, i) *in vivo*, sobre la memoria espacial dependiente de hipocampo, a nivel basal y en modelos de deterioro de la memoria, e ii) *in vitro*, analizando su efecto sobre la plasticidad sináptica hipocampal y la transmisión glutamatérgica.

Nuestros resultados revelan que la TB produce efectos beneficiosos sobre el deterioro de la memoria espacial hipocampal en ratones adolescentes y que interviene en los procesos de transmisión y plasticidad sináptica del hipocampo, siendo capaz de modular la LTP evocando una forma más duradera de este fenómeno de plasticidad. Dicha facilitación es bloqueada por el antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662, y por el inhibidor de AMPK, C-C, lo que permite proponer a PPAR $\gamma$  y AMPK como las dianas moleculares implicadas en los efectos de la TB.

### 5.1. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre el peso corporal, la ingesta calórica y la cantidad de tejido adiposo

Nuestros resultados mostraron que la ingesta de una dieta con TB no producía ningún efecto sobre la ingesta calórica ni durante el tratamiento agudo (48 horas; Figura 20B, D; Tabla 11) ni durante el tratamiento crónico (20 semanas; Figura 16B). Además, durante ambos tratamientos se mantuvo estable el peso corporal (Figura 16A, Figura 20A), aunque

llamativamente observamos una disminución del peso corporal en los animales adultos tras 48 horas de dieta con 3% de TB (Figura 20C), debida probablemente a la reducción del tejido adiposo (TAS, TAL y TAE; Tabla 12) así como a la menor acumulación de lípidos en el TAS (Figura 21B). Estos datos están en concordancia con los encontrados por otros autores, que ponen de manifiesto que el tratamiento con una dieta rica en AB disminuía el peso corporal y la adiposidad en animales tratados con una dieta HF (Vinolo *y cols.*, 2011; Arnoldussen *y cols.*, 2017). Este estudio mostraba además que la intervención con AB reducía, e incluso restauraba, los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol e insulina, aumentados por la dieta HF (Arnoldussen *y cols.*, 2017). En relación con este efecto, es sabido que el receptor de adiponectina, una adipoquina que mejora la sensibilidad a la insulina (Civitarese *y cols.*, 2006), participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos a través de sus receptores, ADIPOQR1 y ADIPOQR2 (Yamauchi *y cols.*, 20014), lo que podría estar relacionado con los efectos del AB en la obesidad. Así, estudios previos han demostrado que el tratamiento con AB en ratones con obesidad inducida por una dieta HF provocaba un aumento en la expresión génica de ADIPOQR2 en el músculo gastrocnemio (Hong *y cols.*, 2016). En este trabajo, hemos detectado una regulación al alza de ADIPOQR2 en el hipocampo (Figura 23C, Tabla 10), que podría mediar en los efectos beneficiosos del AB en el SNC. Sin embargo, en nuestro caso, y probablemente debido a que en los animales analizados no existía obesidad previa, no se encontraron cambios en los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol, triglicéridos, NEFA, leptina, adiponectina e insulina en ninguno de los tratamientos con TB (48 horas, Tabla 13; 20 semanas, Tabla 9). No obstante, el hecho de encontrar disminución de la cantidad de tejido adiposo nos hace apoyar la idea de que el AB tiene un efecto beneficioso sobre el control del apetito y la homeostasis energética.

## 5.2. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre la memoria espacial

Nuestros resultados indican que ni el tratamiento crónico (Figura 18) ni el tratamiento agudo (Figura 22A) con las dietas con TB modulan la memoria espacial evaluada en el laberinto en Y en animales sin previo deterioro cognitivo. Esto nos hace hipotetizar que probablemente exista un efecto techo en el procedimiento, tal y como se ha demostrado en estudios realizados por otros autores (Ricciarelli, y *cols.*, 2017). Sin embargo, en los experimentos realizados en animales a los que se administró SCOP para inducir el deterioro de la memoria espacial, observamos que la ingesta durante 48 h de una dieta con TB (1%) revertía el efecto de la SCOP en animales adolescentes mientras que no producía ningún efecto en animales adultos (Figura 22B y C, respectivamente). Este hallazgo concuerda con los encontrados por otros autores que observaron que el AB protegía y revertía los déficits de aprendizaje y memoria asociados a la EA (Fernando y *cols.*, 2020) y a los producidos por dietas altas en grasa (Arnoldussen y *cols.*, 2017).

Según diversos autores, la inhibición de histonas es el mecanismo responsable de los efectos beneficiosos del AB (Stilling y *cols.*, 2016). Así, se ha visto que la administración de AB mejora la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris solo cuando existe deterioro inducido con SCOP (Topuz y *cols.*, 2020). Otros autores han observado los mismos efectos beneficiosos del AB sobre los déficits de memoria y aprendizaje en ratones con una pérdida neuronal masiva (Fischer y *cols.*, 2007) o en ratas sometidas a estrés prolongado (Mohammadi-Farani, Pourmotabbed, y Ardeshirizadeh, 2020). Se ha propuesto la implicación del receptor PPAR $\gamma$  en la inhibición de la desacetilación de histonas inducida por los AGCC, en una posible sinergia entre dicho receptor y el proceso de inhibición de la HDAC en la neuroprotección del hipocampo (Mishra y *cols.*, 2014). En este sentido, nuestros resultados muestran que el tratamiento con TB aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  en el hipocampo (Figura 23C) y que éste tiene un

papel relevante en los efectos de la TB sobre la plasticidad sináptica hipocampal (Figura 26A). Estos hallazgos sugieren que este receptor puede estar implicado en los efectos de la TB sobre la memoria espacial, tal y como demuestran otros autores (Xiang y cols., 2012). Nuestros datos apuntan a que el efecto beneficioso de la TB sólo se observa en animales adolescentes (Figura 22B); con los datos de que disponemos no podemos dar ninguna explicación de este fenómeno, aunque podría relacionarse con el hecho de que sólo durante la edad temprana se aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  (Akyürek y cols., 2013).

Aunque nuestros resultados ponen de manifiesto la implicación del PPAR $\gamma$  en los efectos de la TB, no podemos descartar que haya otras vías implicadas en la mejora de la memoria espacial. Así, por ejemplo, existen estudios que demuestran que la producción elevada de AB por la microbiota intestinal sana reduce la neuroinflamación e incrementa los niveles de BDNF, aumentando así la plasticidad sináptica (Berni Canani, Di Costanzo, y Leone, 2012; Stilling y cols., 2016). De hecho, otros autores han encontrado mejoras significativas en el laberinto acuático de Morris elevando la cantidad de BDNF y AB, lo que disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo de ratas con deterioro cognitivo asociado a la edad (Romo-Araiza y cols., 2018).

### **5.3. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre la expresión de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA**

Nuestros resultados muestran que la administración de TB durante 48 horas induce la expresión de la mayoría de las subunidades de los receptores glutamatérgicos, como AMPAR2, NMDAR1 y NMDAR2B (Figura 23A), todos ellos implicados en la transmisión sináptica basal (Hunt y Castillo, 2012). Actualmente, existe una idea generalizada de que las alteraciones de la microbiota intestinal desregulan la expresión de BDNF y

de los NMDAR en el SNC (Diaz Heijtz y *co/s.*, 2011), lo que justificaría su impacto en el aprendizaje y la memoria (Lu, Nagappan, y Lu, 2014). En relación con esto, se están llevando a cabo estudios para investigar la capacidad de los AGCC de normalizar la composición microbiana de la flora intestinal y su efecto sobre los trastornos de memoria (Maqsood y Stone, 2016). En esta línea, se ha demostrado que la alimentación prebiótica, que produce cantidades significativas de AGCC, da como resultado niveles más altos de expresión de las subunidades del receptor NMDA en el hipocampo y la corteza frontal (Kao, Harty, y Burnet, 2016). De hecho, en ratones libres de gérmenes se ha observado una reducción en los niveles de expresión génica de receptores NMDA, asociada a una alteración de los procesos de aprendizaje y memoria, que se normalizan mediante la recolonización microbiana durante la edad temprana (Sudo y *co/s.*, 2004; Diaz Heijtz y *co/s.*, 2011; Desbonnet y *co/s.*, 2014). Sin embargo, la recolonización bacteriana de ratones libres de gérmenes en la edad adulta no restaura los déficits neurobiológicos y conductuales (Sudo y *co/s.*, 2004). Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados, que muestran un aumento de las subunidades de estos receptores únicamente con el tratamiento agudo en ratones adolescentes y son coherentes con otros estudios que han puesto de manifiesto efectos beneficiosos de la fibra dietética, la principal fuente de AGCC (Track y *co/s.*, 1985).

Por otro lado, los cambios observados en los niveles de expresión génica de los receptores de Glu son específicos del hipocampo, ya que se llevó a cabo el estudio de expresión génica en la CPF y no se encontraron diferencias entre los grupos de tratamiento dietético con TB (Tabla 14). En conflicto con estos resultados, investigaciones previas han encontrado aumento en la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el hipocampo, pero también en la CPF, tras la ingesta de AGCC, particularmente, AB (Kao y *co/s.*, 2016). En esta línea, hay autores que han demostrado que la mejora en la memoria de reconocimiento tras la administración de probióticos, que aumenta la producción de AB, está mediada por una regulación a la baja de la expresión del gen del receptor

de serotonina 1A (Szklyany y cols., 2020) y a un aumento de expresión génica de BDNF en la CPF y el hipocampo (Fleming y cols., 2019; Szklyany y cols., 2020).

Tanto AMPAR2 como NMDAR1 son las unidades constitutivas de los receptores AMPA y NMDA respectivamente, por lo que un aumento en la expresión de estos genes podría indicar que hay un incremento en el número de receptores glutamatérgicos en la sinapsis. Sin embargo, al estudiar la expresión proteica de las diferentes subunidades no se halló una relación directa entre el nivel de ARNm y el nivel de proteína en la dieta con 1% de TB. Sin embargo, sí había un aumento de expresión proteica de las subunidades NMDA2A y NMDA2B en el grupo que ingirió la dieta con 3% de TB (Figura 24). En la línea con otros autores, la correlación entre el nivel de expresión de un gen y de su correspondiente proteína es solo del 40%, ya que en el nivel de expresión de la proteína intervienen otros factores como los cambios post-transcripcionales (Vogel y Marcotte, 2012; Challenor y cols., 2015). Esta diferencia, puede deberse a que la transcripción es un proceso más rápido que la traducción de proteínas, por lo que la RT-qPCR podría estar midiendo un cambio temprano inducido por la dieta de TB al 1%, mientras que las alteraciones a nivel de síntesis de proteínas no se reflejan aún. Como posibilidad se podría hipotetizar que la TB afectaría a las vías de tráfico de NMDAR llevando a la migración del conjunto citosólico hacia la membrana o incluso a una difusión lateral del propio *pool* de membrana hacia una posición postsináptica de membrana (Penn y cols., 2017).

#### **5.4. Efecto del consumo agudo y crónico de TB sobre la expresión génica de PPAR $\gamma$**

Se ha demostrado que los AGCC, y en particular el AB, modula la actividad PPAR $\gamma$  (Alex y cols., 2013; Nepelska y cols., 2017), expresado abundantemente en el tejido adiposo donde juega un papel central en la adipogénesis y en la regulación del metabolismo de los lípidos (Janani y

Ranjitha Kumari, 2015). El receptor PPAR $\gamma$  del tejido adiposo protege a los tejidos no adiposos contra la sobrecarga lipídica excesiva normalizando la resistencia sistémica a insulina, manteniendo así la función normal del resto de órganos y, además, garantiza una secreción equilibrada y adecuada de adipoquinas como la adiponectina, la leptina y la insulina (Kintscher y Law, 2005).

Nuestros datos muestran que el consumo crónico de TB (0,5%) disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  en el TAE (Figura 19B), tal y como se ha demostrado en otros estudios llevados a cabo con dietas ricas en AGCC (den Besten y cols., 2015). No obstante, este efecto no se observó tras la administración aguda de TB (Tabla 15), lo que parece indicar que para que se den los efectos beneficiosos inducidos por los AGCC en el tejido adiposo, es necesario un tratamiento crónico con estos ácidos grasos.

Además de en el tejido adiposo, PPAR $\gamma$  también se expresa en el SNC (Inestrosa y cols., 2005; Villapol, 2018), donde nuestros resultados muestran la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en el hipocampo (Figura 23C) en el grupo tratado con un 1% de TB de forma aguda. Es llamativo que esta regulación del receptor es específica del hipocampo ya que en la CPF no observamos cambios (Tabla 14). Esta modulación del receptor podría explicar, al menos en parte, que la TB, actuando a través del receptor PPAR $\gamma$ , pueda ejercer efectos beneficiosos en los procesos que subyacen al aprendizaje y la memoria, tal y como hemos demostrado en este trabajo.

Estudios previos han sugerido que la activación de PPAR $\alpha/\gamma$  previene las alteraciones hipocampales que afectan al aprendizaje y a la memoria (Ormerod y cols., 2013). En este sentido, se ha demostrado que los agonistas PPAR, asociados a AB, tienen efecto neuroprotector en modelos animales de trastornos neurodegenerativos (Mishra, Chaudhary, y Kumar, 2014). Este efecto neuroprotector podría estar mediado por los efectos antiinflamatorios derivados de la activación de receptores PPAR, tal y como se ha propuesto por otros autores (Janani y Ranjitha Kumari, 2015), en condiciones neurodegenerativas o con daño neuronal (Govindarajan y cols., 2011; Mishra y cols., 2014). En este sentido,

experimentos recientes han demostrado que el tratamiento combinado de AB y pioglitazona revertía la inflamación y la pérdida de neuronas hipocampales inducida por una dieta alta en fructosa (Li y cols., 2019).

Por otro lado, nuestros experimentos electrofisiológicos revelan un papel clave en la modulación de la plasticidad sináptica por TB (Figura 26A) por lo que, uniendo este hecho a los resultados en la expresión génica hipocampal, podemos hipotetizar que la regulación de la expresión de PPAR $\gamma$  por TB en el hipocampo es una parte del mecanismo que explica la mejoría de los déficits de memoria.

### **5.5. Efecto de la TB *in vitro* sobre la transmisión glutamatérgica hipocampal y la plasticidad sináptica**

Uno de los resultados más relevantes de nuestro trabajo es la capacidad de la TB y del AB (Figuras 25C y 31A, respectivamente) para transformar la *e*-LTP, generada por un único tren de HFS, en *l*-LTP, un mecanismo de plasticidad que requiere la transcripción de proteínas de *novo* (Raymond y Redman, 2006). Así, hipotetizamos que la TB induce la síntesis de proteínas requeridas para el establecimiento de memorias de mayor duración y, ya que ésta se hidroliza dando como resultado AB, este efecto se podría deber a este ácido graso.

Sin embargo, hemos visto diferencias entre la TB y el AB en las concentraciones de aminoácidos en el hipocampo implicados en la transmisión sináptica hipocampal. Mientras que el AB disminuye la concentración de GABA y aumenta la de Glu (Tabla 17), las rodajas de hipocampo incubadas con TB no alteran las concentraciones de estos aminoácidos (Tabla 16). Esto nos hace suponer que la TB podría degradarse siendo el propio AB el que está actuando sobre la transmisión y plasticidad sináptica hipocampales.

Se ha puesto de manifiesto que la transición de *early* a *late* LTP puede implicar la traducción de ARNm (Pastalkova y cols., 2006), dando lugar a un fenómeno de marcado sináptico (Frey y Morris, 1997) que implica

a diversas quinasas, como CaMKII (Murakoshi y *cols.*, 2017), PKA (Huang y Kandel, 1994; Nguyen y Kandel, 1996), PKM $\zeta$  (Sacktor y Fenton, 2018) o AMPK (Marinangeli y *cols.*, 2018).

Nuestros resultados muestran que la modulación de la LTP por TB está mediada por AMPK (Figura 26C). Existen resultados contradictorios en relación con el papel de la AMPK en los procesos cognitivos, ya que algunos autores muestran que la hiperactivación de la AMPK explica la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA (Domise y *cols.*, 2019), y también que la inhibición de la AMPK revierte el deterioro en la plasticidad sináptica hipocampal inducido por A $\beta$  (Ma y *cols.*, 2014). En este sentido, se ha visto que la activación farmacológica de la AMPK amortiguó el mantenimiento de la *l*-LTP (Potter y *cols.*, 2010). Del mismo modo, varios estudios han observado la sobreactivación de la AMPK neuronal en el cerebro de pacientes con EA (Vingtdeux y *cols.*, 2011), EP (Jiang y *cols.*, 2013) y enfermedad de Huntington (Ju y *cols.*, 2011), lo que apoya el concepto de que los déficits en la disponibilidad de glucosa y/o la función mitocondrial, capaces de activar la AMPK (Hardie, 2003), están vinculados a los trastornos neurodegenerativos (Domise y Vingtdeux, 2016). Nuestros resultados van en la línea del consenso general respecto al impacto beneficioso de la AMPK en la plasticidad sináptica, incluyendo la LTP (Marinangeli y *cols.*, 2018; Finley, 2018; Didier y *cols.*, 2018). De hecho, resultados muy recientes han relacionado la activación de la AMPK con la mejora del rendimiento del aprendizaje y la memoria hipocampales en un modelo de demencia en ratas (Rashtiani y *cols.*, 2021).

Además, hemos observado que la TB revierte el deterioro de la LTP hipocampal inducido por SCOP, un potente inhibidor de la LTP (Hirotsu y *cols.*, 1989; Calabresi y *cols.*, 1999; Sánchez y *cols.*, 2009; Portero-Tresserra y *cols.*, 2014) (Figura 27A), y se ha demostrado que la activación de los receptores muscarínicos aumenta la actividad de la AMPK *in vitro* (Thornton, Sardini, y Carling, 2008), por lo que cabría esperar que el efecto de la SCOP sobre la LTP estuviera, al menos parcialmente, relacionado con la reducción de la actividad de la AMPK. Por otro lado, nuestros datos

apuntan al efecto beneficioso de la TB sobre el deterioro de la memoria inducido por SCOP (Figura 22B), lo que corroboran estudios previos que muestran que los ratones modificados genéticamente para sobre-expresar la AMPK hipocampal presentan cierta protección para el deterioro de la memoria inducido por SCOP (Kim y cols., 2013), al igual que se han observado efectos beneficiosos sobre la cognición con la administración de AICAR (un activador farmacológico de AMPK) (Potter y cols., 2010; Kim y cols., 2013).

Aunque nuestros resultados no demuestran específicamente la activación de AMPK por TB, podemos sugerir que la regulación al alza del *Adipoqr2* (Figura 23C) podría estar relacionada con dicha activación, tal y como proponen otros autores (Greco y cols., 2009). En este sentido, parece que el receptor de adiponectina está implicado en la LTP hipocampal (Irving y Harvey, 2014; Wang y cols., 2019) y la adiponectina desempeña un papel importante en la remodelación de las espinas dendríticas y la neurogénesis en el hipocampo (Zhang, Wang, y Lu, 2016).

Como ya se ha mencionado, nuestros resultados muestran que la TB modula la plasticidad sináptica del hipocampo a través de PPAR $\gamma$  (Figura 26A), lo que es coherente con su capacidad para regular al alza la expresión del gen *Pparg* (Figura 23C), que ya en condiciones basales presenta niveles elevados de expresión en el área CA1 del hipocampo de rata (Baghcheghi y cols., 2019). Además, se ha relacionado la implicación de PPAR $\gamma$  tanto en el rendimiento cognitivo como en la LTP en modelos patológicos experimentales de deficiencia de seipina neuronal y de envejecimiento (Zhou y cols., 2016; d'Angelo y cols., 2019), y se ha demostrado que los agonistas de PPAR $\gamma$  atenúan el deterioro de la LTP dependiente del péptido A $\beta$  (Costello y cols., 2005). Otros estudios han informado que los agonistas de PPAR $\gamma$  mejoran el aprendizaje y la memoria en modelos de demencia en ratones (Seok y cols., 2019).

Los PPAR $\gamma$  se han relacionado con dos de las moléculas estudiadas en este trabajo, la anandamida y la escopolamina, habiéndose encontrado efectos beneficiosos del agonista PPAR $\gamma$  pioglitazona en el déficit

colinérgico inducido por escopolamina y en el consecuente deterioro cognitivo (Xiang y cols., 2012).

En relación con la señalización endocannabinoide a través de la AEA, se ha visto que ésta está implicada en una variedad de funciones neuronales y se considera un objetivo terapéutico prometedor para numerosos trastornos (Zimmermann y cols., 2019). No obstante, no está muy claro el papel de la AEA en la plasticidad sináptica, de modo que algunos autores sugieren que la sobreexpresión de FAAH, la principal enzima que degrada la AEA, conduce a una mayor plasticidad en las neuronas glutamatérgicas hipocampales (Zimmermann y cols., 2019). Sin embargo, otros autores han demostrado que el cannabidiol, el componente no psicoactivo de *Cannabis sativa*, que aumenta la AEA endógena, protege contra el deterioro de la plasticidad sináptica inducido por A $\beta$  en un modelo *in vitro* en rodajas de hipocampo de ratón, proponiendo que PPAR $\gamma$  es fundamental en el efecto neuroprotector del cannabidiol (Hughes y Herron, 2019). Nuestros resultados, en la línea de Zimmermann y cols. (2019), muestran que la perfusión con AEA de rodajas de hipocampo produce un deterioro de la LTP (Figura 28A), en consonancia con el deterioro que la AEA produce en los procesos de aprendizaje y memoria (Basavarajappa y cols., 2014). Nuestros resultados muestran que la TB revierte el deterioro de la LTP inducido por AEA (Figura 28A), por lo que podemos hipotetizar que la TB interfiere con alguno de los mecanismos implicados en tal deterioro, aunque este aspecto necesita ser clarificado.

Por otro lado, hemos demostrado que la TB regula al alza algunas subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA (Figura 23A), lo que podría explicar, al menos parcialmente, sus efectos sobre la modulación de la plasticidad sináptica. Sin embargo, esta posibilidad debe considerarse con cautela, ya que sus correspondientes proteínas constitutivas no se modificaron. En cualquier caso, nuestros resultados muestran que el bloqueo de los receptores NMDA mediante AP-5 no permite la inducción de LTP evocada por TB (Figura 26E), demostrando así

que los receptores NMDA son necesarios para observar la facilitación de *L*-LTP inducida por TB.

Otro de los datos que se destacan de nuestro trabajo es que la TB inhibe el deterioro de la LTP inducido por el consumo crónico (Figura 29) y agudo de grasas saturadas (Figura 30). Previamente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las dietas con un alto contenido en grasas saturadas inducen, en animales jóvenes, un deterioro permanente de la memoria espacial dependiente del hipocampo (Valladolid-Acebes *y cols.*, 2011), provocando importantes cambios morfológicos en las neuronas hipocámpales y alteraciones en la modulación de la transmisión glutamatérgica (Valladolid-Acebes *y cols.*, 2012; 2013). En experimentos recientes, hemos demostrado que la ingesta de las dietas SOLF y UOLF perjudica la memoria espacial dependiente de hipocampo, siendo la dieta SOLF más perjudicial que la dieta UOLF para los mecanismos de plasticidad sináptica subyacentes a la memoria espacial, como la LTP (Fernández-Felipe *y cols.*, 2021). Además, en este mismo estudio, hemos demostrado la inhibición de la expresión génica de *Pparg* y la disminución de las subunidades 2A y 2B del receptor NMDA en el hipocampo de ratones tratados con la dieta SOLF (Fernández-Felipe *y cols.*, 2021), receptores que se regulan al alza con la dieta de TB al 1% (Figura 23A y C). Estos resultados van en la línea de otros autores que observan reversión del deterioro cognitivo inducido a ratones que consumen dietas HF cuando, posteriormente, estos ratones consumen una dieta rica en AB (Arnoldussen *y cols.*, 2017).

## **5.6. Discusión general**

Los resultados de nuestro trabajo ponen de manifiesto que la administración de una dieta con TB durante 48 h es capaz de revertir en animales jóvenes el deterioro de la memoria inducido por SCOP, lo que corrobora los resultados encontrados por otros laboratorios que relacionan la ingesta de AGCC con efectos beneficiosos sobre la cognición de algunas enfermedades que causan neurodegeneración. Además, nuestros

experimentos de plasticidad sináptica revelan que la TB revierte la inhibición de la LTP inducida por otros fármacos como la SCOP y la AEA, así como la inducida por dietas altas en grasa saturada. Estos hallazgos, junto a que la ingesta de esta molécula no produce ningún efecto en animales sanos, nos hace suponer que la modulación se produce sólo en procesos patológicos.

Con el fin de conocer el mecanismo por el cual la TB produce este efecto, en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo diversos experimentos cuyos resultados nos permiten afirmar que la TB actúa a través de la modulación de la expresión de génica de las subunidades del receptor de Glu implicadas en los procesos de transmisión sináptica y plasticidad que subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje (AMPA-2, NMDA-1, NMDA-2A y NMDA-2B). Este fenómeno se produce en el hipocampo, pero no en la CPF. Además de los receptores glutamatérgicos, otros receptores, como PPAR $\gamma$  o el receptor de adiponectina ADIPOQR2, parecen estar detrás del efecto beneficioso de la TB. Además, hemos detectado la implicación de AMPK. Aunque no hemos comprobado una relación entre la implicación de PPAR $\gamma$  y la activación de AMPK, podemos hipotetizar que la activación de AMPK podría depender de PPAR $\gamma$ . Nuestros datos se correlacionan con los encontrados por otros autores que dicen que los AGCC son beneficiosos en el deterioro cognitivo y que, incluso, se proponen como tratamiento para estas patologías (Arnoldussen y cols., 2017; Li y cols., 2019).

Nuestros resultados muestran que la TB es capaz de transformar la e-LTP en /LTP y que dicha facilitación se bloquea por GW9662 y C-C. En conjunto, los hallazgos precedentes revelan que la transformación de e-LTP en /LTP implica tanto a AMPK como a PPAR $\gamma$ , y apoya el concepto de que estas proteínas podrían ser parte integral de una vía de señalización común que explica los efectos de la TB. Curiosamente, se ha demostrado que la activación de PPAR $\gamma$  promueve una mayor activación y fosforilación de AMPK (Lee y Kim, 2010). De hecho, PPAR $\gamma$  es una diana de los AGCC

(Li, Yao, y Jiang, 2014; Marion-Letellier, Savoye, y Ghosh, 2016) y, por lo tanto, se esperaría la participación de PPAR $\gamma$  en los efectos de la TB.

A partir de nuestro trabajo, destacamos dos resultados; por un lado, que los efectos de la TB sólo se encuentran en animales adolescentes, poniendo de manifiesto la especial vulnerabilidad y sensibilidad del hipocampo ante cambios funcionales en los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria en edades tempranas. Por otro lado, encontramos esta mejoría con un tratamiento agudo (48 h) de TB, que no se había reportado previamente, ya que otros autores demuestran efectos similares con AB, pero con un mínimo de 10 días de tratamiento (Hong y *cols.*, 2016). Suponemos que el tratamiento con TB es más eficaz debido a que, como se ha mencionado previamente, el AB se metaboliza rápidamente y parece poco probable que éste ingrese al cerebro en concentraciones lo suficientemente altas como para ejercer efectos directos. Sin embargo, la TB difunde a través de las membranas biológicas y es metabolizada por las enzimas de membrana, liberando lentamente y de forma prolongada AB terapéuticamente eficaz directamente en las células (Stilling y *cols.*, 2016).

En conclusión, el estudio de la TB llevado a cabo en este trabajo, sugiere que este precursor de AB interviene en los procesos de transmisión y plasticidad sináptica hipocampales y produce efectos beneficiosos sobre el deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo, proponiendo a PPAR $\gamma$  y AMPK como las dianas moleculares que podrían participar en los efectos mediados por la TB, sugiriendo que puede ser una herramienta prometedora dotada de potencial terapéutico en condiciones de deterioro de la memoria.

## CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

---

- I. El tratamiento agudo con TB no mejora la memoria espacial en animales sanos, pero inhibe el deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo inducido por escopolamina en ratones adolescentes. Esto pone de manifiesto el potencial terapéutico de la TB, lo que convierte a esta molécula en una herramienta prometedora en determinadas condiciones de deterioro de la memoria.
- II. El tratamiento agudo con TB aumenta, específicamente en el hipocampo, la expresión génica y proteica de los receptores de glutamato, sugiriendo que la TB modula la transmisión glutamatérgica hipocampal y favoreciendo los procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica.
- III. El tratamiento agudo con TB regula al alza el receptor PPAR $\gamma$  específicamente en el hipocampo, poniendo el foco en este receptor como uno de los posibles mecanismos implicados en la mejora de la memoria.
- IV. Los cambios observados en el tratamiento agudo con TB desaparecen en el tratamiento crónico, lo que hace suponer que existen adaptaciones en el hipocampo tras el consumo continuado de estas dietas.
- V. La TB *in vitro* es capaz de transformar la e-LTP en *I*-LTP, y este fenómeno depende de la proteína AMPK y el receptor PPAR $\gamma$ , lo que sugiere que ambos forman parte de una vía de señalización común que explica los efectos de la TB.
- VI. La TB revierte *in vitro* la inhibición de la LTP inducida por fármacos como la escopolamina y la anandamida, así como la inducida por dietas altas en grasa saturadas, proponiendo a este precursor del AB como potencial modulador de los procesos subyacentes al aprendizaje y la memoria.



## BIBLIOGRAFÍA





## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., y Bourtchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 88(5), 615-626. doi:10.1016/s0092-8674(00)81904-2
- Adams, M. M., Shah, R. A., Janssen, W. G., y Morrison, J. H. (2001). Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8071–8076. doi.org/10.1073/pnas.141215898
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., y Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: From genes to cognition. *Physiological Reviews*, 94(4), 991-1026. doi:10.1152/physrev.00004.2014
- Akyürek, N., Aycan, Z., Çetinkaya, S., Akyürek, Ö., Yılmaz Aǧladioǧlu, S., y Ertan, Ü. (2013). Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-gamma concentrations in childhood obesity. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 73(4), 355–360. doi.org/10.3109/00365513.2013.786121
- Alex, S., Lange, K., Amolo, T., Grinstead, J. S., Haakonsson, A. K., Szalowska, E., . . . Kersten, S. (2013). Short-chain fatty acids stimulate angiopoietin-like 4 synthesis in human colon adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Molecular and Cellular Biology*, 33(7), 1303-1316. doi:10.1128/MCB.00858-12
- Ang, Z., Xiong, D., Wu, M., y Ding, J. L. (2018). FFAR2-FFAR3 receptor heteromerization modulates short-chain fatty acid sensing. *The FASEB Journal*, 32(1), 289-303. doi:10.1096/fj.201700252RR
- Anwyl R. (2009). Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology*, 56(4), 735–740. doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.01.002
- Arnoldussen, I. a. C., Wiesmann, M., Pelgrim, C. E., Wielemaker, E. M., Duyvenvoorde, W. v., Amaral-Santos, P. L., . . . Kiliaan, A. J. (2017). Butyrate restores HFD-induced adaptations in brain function and metabolism in mid-adult obese mice. *International Journal of Obesity*, 41(6), 935-944. doi:10.1038/ijo.2017.52
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., . . . Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451-455. doi:10.1038/nature12726
- Astbury, S. M., y Corfe, B. M. (2012). Uptake and metabolism of the short-chain fatty acid butyrate, a critical review of the literature. *Current drug metabolism*, 13(6), 815–821. doi.org/10.2174/138920012800840428

- Atkinson, R. C., y Shiffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. In *Psychology of learning and motivation* (Vol. 2, pp. 89-195). Academic Press.
- Baddeley, A. (1981). The concept of working memory: A view of its current state and probable future development. *Cognition*, *10*(1-3), 17-23. doi:10.1016/0010-0277(81)90020-2
- Baez, M. V., Cercato, M. C., y Jerusalinsky, D. A. (2018). NMDA receptor subunits change after synaptic plasticity induction and learning and memory acquisition. *Neural Plasticity*, *2018*, 5093048. doi:10.1155/2018/5093048
- Baghcheghi, Y., Salmani, H., Beheshti, F., Shafei, M. N., Sadeghnia, H. R., Soukhtanloo, M., . . . Hosseini, M. (2019). Effects of PPAR- $\gamma$  agonist, pioglitazone on brain tissues oxidative damage and learning and memory impairment in juvenile hypothyroid rats. *The International Journal of Neuroscience*, *129*(10), 1024-1038. doi:10.1080/00207454.2019.1632843
- Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., y Baltaci, A. K. (2019). Molecular mechanisms of early and late LTP. *Neurochemical Research*, *44*(2), 281-296. doi:10.1007/s11064-018-2695-4
- Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., y Abu-Farha, M. (2016). The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids in Health and Disease*, *15*. doi:10.1186/s12944-016-0278-4
- Basavarajappa, B. S., Nagre, N. N., Xie, S., y Subbanna, S. (2014). Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. *Hippocampus*, *24*(7), 808-818. doi:10.1002/hipo.22272
- Berni Canani, R., Di Costanzo, M., y Leone, L. (2012). The epigenetic effects of butyrate: Potential therapeutic implications for clinical practice. *Clinical Epigenetics*, *4*(1), 4. doi:10.1186/1868-7083-4-4
- Bir, S. C., Ambekar, S., Kukreja, S., y Nanda, A. (2015). Julius caesar arantius (giulio cesare aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: History behind the discovery. *Journal of Neurosurgery*, *122*(4), 971-975. doi:10.3171/2014.11JNS132402
- Bliss, T. V., y Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31-39. doi:10.1038/361031a0
- Bliss, T. V., y Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, *232*(2), 331-356. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273
- Bolognini, D., Tobin, A. B., Milligan, G., y Moss, C. E. (2016). The pharmacology and function of receptors for short-chain fatty acids. *Molecular Pharmacology*, *89*(3), 388-398. doi:10.1124/mol.115.102301

- Bolshakov, V. Y., y Siegelbaum, S. A. (1994). Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5162), 1148–1152. doi.org/10.1126/science.7909958
- Borre, Y. E., O'Keefe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: Implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509-518. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.002
- Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S. A., Silva, A. J., Davis, S., y Laroche, S. (2003). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1432), 805–814. doi.org/10.1098/rstb.2002.1224
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., . . . Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263), 263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759
- Brem, A., Ran, K., y Pascual-Leone, A. (2013). Learning and memory. *Handbook of Clinical Neurology*, 116, 693-737. doi:10.1016/B978-0-444-53497-2.00055-3
- Bugaut, M. (1987). Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 86(3), 439-472. doi:10.1016/0305-0491(87)90433-0
- Burokas, A., Arboleya, S., Moloney, R. D., Peterson, V. L., Murphy, K., Clarke, G., . . . Cryan, J. F. (2017). Targeting the microbiota-gut-brain axis: Prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biological Psychiatry*, 82(7), 472-487. doi:10.1016/j.biopsych.2016.12.031
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., y Bernardi, G. (1999). Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology*, 38(2), 323-326. doi:10.1016/S0028-3908(98)00199-3
- Calvani, R., Picca, A., Lo Monaco, M. R., Landi, F., Bernabei, R., y Marzetti, E. (2018). Of microbes and minds: A narrative review on the second brain aging. *Frontiers in Medicine*, 5, 53. doi:10.3389/fmed.2018.00053
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., y Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 577-591. doi:10.1038/nrendo.2015.128

- Challenor, M., O'Hare Doig, R., Fuller, P., Giacci, M., Bartlett, C., Wale, C. H., . . . Fitzgerald, M. (2015). Prolonged glutamate excitotoxicity increases GluR1 immunoreactivity but decreases mRNA of GluR1 and associated regulatory proteins in dissociated rat retinae in vitro. *Biochimie*, 112, 160-171. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.008
- Chambers, E. S., Morrison, D. J., y Frost, G. (2015). Control of appetite and energy intake by SCFA: What are the potential underlying mechanisms? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 74(3), 328-336. doi:10.1017/S0029665114001657
- Chang, E. H., Carreiro, S. T., Frattini, S. A., y Huerta, P. T. (2019). Assessment of glutamatergic synaptic transmission and plasticity in brain slices: Relevance to bioelectronic approaches. *Bioelectronic Medicine*, 5 doi:10.1186/s42234-019-0022-2
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156–159. doi.org/10.1006/abio.1987.9999
- Chowdhury, D., y Hell, J. W. (2019). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Binding to PSD-95 Downregulates Its Palmitoylation and AMPARs in Long-Term Depression. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 11, 6. doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00006
- Citri, A., y Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18-41. doi:10.1038/sj.npp.1301559
- Civitaresse, A. E., Ukropcova, B., Carling, S., Hulver, M., DeFronzo, R. A., Mandarino, L., Ravussin, E., y Smith, S. R. (2006). Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. *Cell metabolism*, 4(1), 75–87. doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.002
- Clark, R. E. (2018). A history and overview of the behavioral neuroscience of learning and memory. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 37, 1-11. doi:10.1007/7854\_2017\_482
- Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., y Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(8), 1221-1238. doi:10.1210/me.2014-1108
- Clayton, D. A., Grosshans, D. R., y Browning, M. D. (2002). Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277(17), 14367–14369. doi.org/10.1074/jbc.C200074200
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., y Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56(1), 2-5. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.063
- Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., y Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(7), 459-473. doi:10.1038/nrn2867

- Conley, B. A., Egorin, M. J., Tait, N., Rosen, D. M., Sausville, E. A., Dover, G., . . . Van Echo, D. A. (1998). Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(3), 629-634.
- Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E., y Sonenberg, N. (2009). Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, 61(1), 10-26. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.055
- Costello, D. A., O'Leary, D. M., y Herron, C. E. (2005). Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma attenuate the abeta-mediated impairment of LTP in the hippocampus in vitro. *Neuropharmacology*, 49(3), 359-366. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.03.009
- Cowan, N. (2001). The magical number 4 in short-term memory: A reconsideration of mental storage capacity. *The Behavioral and Brain Sciences*, 24(1), 87-185. doi:10.1017/s0140525x01003922
- Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., . . . Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877-2013. doi:10.1152/physrev.00018.2018
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., y Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227. doi:10.1136/gut.28.10.1221
- Dale, N., Kandel, E. R., y Schacher, S. (1987). Serotonin produces long-term changes in the excitability of aplysia sensory neurons in culture that depend on new protein synthesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7(7), 2232-2238.
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., y Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature Reviews. Gastroenterology y Hepatology*, 16(8), 461-478. doi:10.1038/s41575-019-0157-3
- d'Angelo, M., Castelli, V., Catanese, M., Antonosante, A., Dominguez-Benot, R., Ippoliti, R., . . . Cimini, A. (2019). PPAR $\gamma$  and cognitive performance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20) doi:10.3390/ijms20205068
- Danielson, N. B., Zaremba, J. D., Kaifosh, P., Bowler, J., Ladow, M., y Losonczy, A. (2016). Sublayer-specific coding dynamics during spatial navigation and learning in hippocampal area CA1. *Neuron*, 91(3), 652-665. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.020
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., . . . Mithieux, G. (2014). Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156(1-2), 84-96. doi:10.1016/j.cell.2013.12.016

- den Besten, G., Bleeker, A., Gerding, A., van Eunen, K., Havinga, R., van Dijk, T. H., . . . Bakker, B. M. (2015). Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR $\gamma$ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*, *64*(7), 2398-2408. doi:10.2337/db14-1213
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry*, *19*(2), 146-148. doi:10.1038/mp.2013.65
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., . . . Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(7), 3047-3052. doi:10.1073/pnas.1010529108
- Didier, S., Sauvé, F., Domise, M., Buée, L., Marinangeli, C., y Vingtdeux, V. (2018). AMP-activated protein kinase controls immediate early genes expression following synaptic activation through the PKA/CREB pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12) doi:10.3390/ijms19123716
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., Gundelfinger, E. D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., y Barde, Y. A. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *The Journal of cell biology*, *196*(6), 775–788. doi.org/10.1083/jcb.201201038
- Domise, M., Sauvé, F., Didier, S., Caillerez, R., Bégard, S., Carrier, S., . . . Vingtdeux, V. (2019). Neuronal AMP-activated protein kinase hyper-activation induces synaptic loss by an autophagy-mediated process. *Cell Death y Disease*, *10*(3), 221. doi:10.1038/s41419-019-1464-x
- Domise, M., y Vingtdeux, V. (2016). AMPK in neurodegenerative diseases. *Experientia Supplementum* (2012), *107*, 153-177. doi:10.1007/978-3-319-43589-3\_7
- Du, L., Chai, D., Zhao, L., Li, X., Zhang, F., Zhang, H., . . . Zhou, X. (2015). AMPK activation ameliorates alzheimer's disease-like pathology and spatial memory impairment in a streptozotocin-induced alzheimer's disease model in rats. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *43*(3), 775-784. doi:10.3233/JAD-140564
- Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E., y Flint, H. J. (2002). Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 5186-5190. doi:10.1128/AEM.68.10.5186-5190.2002
- Duncan, S. H., Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S., y Flint, H. J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *The British journal of nutrition*, *91*(6), 915–923. doi.org/10.1079/BJN20041150
- Ebbinghaus, H. (2013). Memory: A contribution to experimental psychology. *Annals of Neurosciences*, *20*(4), 155-156. doi:10.5214/ans.0972.7531.200408

- Egorin, M. J., Yuan, Z. -, Sentz, D. L., Plaisance, K., y Eiseman, J. L. (1999). Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 43(6), 445-453. doi:10.1007/s002800050922
- Ekstrom, A. D., Meltzer, J., McNaughton, B. L., y Barnes, C. A. (2001). NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". *Neuron*, 31(4), 631-638. doi:10.1016/s0896-6273(01)00401-9
- Erny, D., Hrabě de Angelis, Anna Lena, Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., . . . Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, 18(7), 965-977. doi:10.1038/nn.4030
- Erny, D., Hrabě de Angelis, Anna Lena, y Prinz, M. (2017). Communicating systems in the body: How microbiota and microglia cooperate. *Immunology*, 150(1), 7-15. doi:10.1111/imm.12645
- Ferbinteanu, J. (2019). Memory systems 2018 - towards a new paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, 157, 61-78. doi:10.1016/j.nlm.2018.11.005
- Fernández-Felipe, J., Merino, B., Sanz-Martos, A. B., Plaza, A., Contreras, A., Naranjo, V., . . . Del Olmo, N. (2021). Saturated and unsaturated fat diets impair hippocampal glutamatergic transmission in adolescent mice. *Psychoneuroendocrinology*, 133, 105429. doi:10.1016/j.psyneuen.2021.105429
- Fernando, W., Martins, I. J., Morici, M., Bharadwaj, P., Rainey-Smith, S. R., Lim, W. L. F., y Martins, R. N. (2020). Sodium butyrate reduces brain amyloid- $\beta$  levels and improves cognitive memory performance in an alzheimer's disease transgenic mouse model at an early disease stage. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 74(1), 91-99. doi:10.3233/JAD-190120
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., y De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- $\beta$  oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 191. doi:10.3389/fncel.2015.00191
- Filiano, A. J., Gadani, S. P., y Kipnis, J. (2015). Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Research*, 1617, 18-27. doi:10.1016/j.brainres.2014.07.050
- Finley, J. (2018). Facilitation of hippocampal long-term potentiation and reactivation of latent HIV-1 via AMPK activation: Common mechanism of action linking learning, memory, and the potential eradication of HIV-1. *Medical Hypotheses*, 116, 61-73. doi:10.1016/j.mehy.2018.04.018
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., y Tsai, L. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, 447(7141), 178-182. doi:10.1038/nature05772

- Fleming, S. A., Monaikul, S., Patsavas, A. J., Waworuntu, R. V., Berg, B. M., y Dilger, R. N. (2019). Dietary polydextrose and galactooligosaccharide increase exploratory behavior, improve recognition memory, and alter neurochemistry in the young pig. *Nutritional Neuroscience*, 22(7), 499-512. doi:10.1080/1028415X.2017.1415280
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., y Beas-Zarate, C. (2012). Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 27(5), 301-310. doi:10.1016/j.nrl.2011.10.014
- Forsythe, P., Bienenstock, J., y Kunze, W. A. (2014). Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 115-133. doi:10.1007/978-1-4939-0897-4\_5
- Frey, U., Huang, Y. Y., y Kandel, E. R. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5114), 1661-1664. doi:10.1126/science.8389057
- Frey, U., y Morris, R. G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616), 533-536. doi:10.1038/385533a0
- Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., . . . Holzer, P. (2016). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, 56, 140-155. doi:10.1016/j.bbi.2016.02.020
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., . . . Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, 5, 3611. doi:10.1038/ncomms4611
- Fung, T. C., Olson, C. A., y Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, 20(2), 145-155. doi:10.1038/nn.4476
- Garcez, M. L., de Carvalho, C. A., Mina, F., Bellettini-Santos, T., Schiavo, G. L., da Silva, S., . . . Budni, J. (2018). Sodium butyrate improves memory and modulates the activity of histone deacetylases in aged rats after the administration of D-galactose. *Experimental Gerontology*, 113, 209-217. doi:10.1016/j.exger.2018.10.005
- Gaschott, T., Steinhilber, D., Milovic, V., y Stein, J. (2001). Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. *The Journal of nutrition*, 131(6), 1839-1843. doi.org/10.1093/jn/131.6.1839
- Gibson, B. M., y Mair, R. (2016). A pathway for spatial memory encoding. *Learning y Behavior*, 44(2), 97-98. doi:10.3758/s13420-016-0214-5

- Govindarajan, N., Agis-Balboa, R. C., Walter, J., Sananbenesi, F., y Fischer, A. (2011). Sodium butyrate improves memory function in an alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 26(1), 187-197. doi:10.3233/JAD-2011-110080
- Gräff, J., y Tsai, L. (2013). Histone acetylation: Molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(2), 97-111. doi:10.1038/nrn3427
- Greco, S. J., Sarkar, S., Johnston, J. M., y Tezapsidis, N. (2009). Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(1), 98-104. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.041
- Greger, I. H., Watson, J. F., y Cull-Candy, S. G. (2017). Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins. *Neuron*, 94(4), 713-730. doi:10.1016/j.neuron.2017.04.009
- Grön, G., Wunderlich, A. P., Spitzer, M., Tomczak, R., y Riepe, M. W. (2000). Brain activation during human navigation: Gender-different neural networks as substrate of performance. *Nature Neuroscience*, 3(4), 404-408. doi:10.1038/73980
- Grosshans, D. R., Clayton, D. A., Coultrap, S. J., y Browning, M. D. (2002). LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nature neuroscience*, 5(1), 27-33. doi.org/10.1038/nn779
- Grover, L. M., y Teyler, T. J. (1990). Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature*, 347(6292), 477-479. doi:10.1038/347477a0
- Guan, J., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J., Joseph, N., Gao, J., . . . Tsai, L. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, 459(7243), 55-60. doi:10.1038/nature07925
- Haering, S. C., Tapken, D., Pahl, S., y Hollmann, M. (2014). Auxiliary subunits: Shepherding AMPA receptors to the plasma membrane. *Membranes*, 4(3), 469-490. doi:10.3390/membranes4030469
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M., y Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801-806. doi:10.1038/nature03721
- Haghikia, A., Jörg, S., Duscha, A., Berg, J., Manzel, A., Waschbisch, A., . . . Linker, R. A. (2015). Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity*, 43(4), 817-829. doi:10.1016/j.immuni.2015.09.007
- Hardie, D. G. (2003). Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 144(12), 5179-5183. doi:10.1210/en.2003-0982

- Hardie, D. G., Ross, F. A., y Hawley, S. A. (2012). AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 251-262. doi:10.1038/nrm3311
- Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., y Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2262–2267. doi.org/10.1126/science.287.5461.2262
- Hebb, D. (1949). *The organization of behavior*. New York.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., Anthony, G. M., y Augenlicht, L. H. (1999). Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. *Cancer Research*, 59(7), 1584-1591.
- Hermans, E., y Challiss, R. A. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *The Biochemical journal*, 359(Pt 3), 465–484. doi.org/10.1042/0264-6021:3590465
- Herrera, E., y Ayanz, A. (1972). Calculation of lipolysis and esterification from glycerol metabolism in rat adipose tissue. *Journal of lipid research*, 13(6), 802–809.
- Herring, B. E., y Nicoll, R. A. (2016). Long-term potentiation: From CaMKII to AMPA receptor trafficking. *Annual Review of Physiology*, 78, 351-365. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071753
- Hirotsu, I., Hori, N., Katsuda, N., y Ishihara, T. (1989). Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 482(1), 194-197. doi:10.1016/0006-8993(89)90561-1
- Ho, L., Ono, K., Tsuji, M., Mazzola, P., Singh, R., y Pasinetti, G. M. (2018). Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 18(1), 83-90. doi:10.1080/14737175.2018.1400909
- Ho, S., Hsieh, Y., Wang, S., y Chen, M. (2019). Improving effect of a probiotic mixture on memory and learning abilities in d-galactose-treated aging mice. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 1901-1909. doi:10.3168/jds.2018-15811
- Hodges, H. (1996). Maze procedures: The radial-arm and water maze compared. *Brain Research. Cognitive Brain Research*, 3(3-4), 167-181. doi:10.1016/0926-6410(96)00004-3
- Hong, J., Jia, Y., Pan, S., Jia, L., Li, H., Han, Z., . . . Zhao, R. (2016). Butyrate alleviates high fat diet-induced obesity through activation of adiponectin-mediated pathway and stimulation of mitochondrial function in the skeletal muscle of mice. *Oncotarget*, 7(35), 56071-56082. doi:10.18632/oncotarget.11267

- Hooper, L. V., Littman, D. R., y Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1268-1273. doi:10.1126/science.1223490
- Hou, L., y Klann, E. (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(28), 6352–6361. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0995-04.2004
- Hu, J., Lin, S., Zheng, B., y Cheung, P. C. K. (2018). Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1243-1249. doi:10.1080/10408398.2016.1245650
- Huang, Y. Y., y Kandel, E. R. (1994). Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learning y Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 1(1), 74-82.
- Huber, K. M., Kayser, M. S., y Bear, M. F. (2000). Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5469), 1254–1257. doi.org/10.1126/science.288.5469.1254
- Hughes, B., y Herron, C. E. (2019). Cannabidiol reverses deficits in hippocampal LTP in a model of alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 44(3), 703-713. doi:10.1007/s11064-018-2513-z
- Hunt, D. L., y Castillo, P. E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: Mechanisms and functional implications. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 496-508. doi:10.1016/j.conb.2012.01.007
- Huuskonen, J., Suuronen, T., Nuutinen, T., Kyrylenko, S., y Salminen, A. (2004). Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *British Journal of Pharmacology*, 141(5), 874-880. doi:10.1038/sj.bjp.0705682
- Inestrosa, N. C., Godoy, J. A., Quintanilla, R. A., Koenig, C. S., y Bronfman, M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: Role of wnt signaling. *Experimental Cell Research*, 304(1), 91-104. doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.032
- Intlekofer, K. A., Berchtold, N. C., Malvaez, M., Carlos, A. J., McQuown, S. C., Cunningham, M. J., . . . Cotman, C. W. (2013). Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(10), 2027-2034. doi:10.1038/npp.2013.104

- Irving, A. J., y Harvey, J. (2014). Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), 20130155. doi:10.1098/rstb.2013.0155
- Jackson, A. C., y Nicoll, R. A. (2011). The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron*, 70(2), 178-199. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.007
- James, W. (1980). *Principles of psychology* New York: Dover Edition.
- Janani, C., y Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene--a review. *Diabetes y Metabolic Syndrome*, 9(1), 46-50. doi:10.1016/j.dsx.2014.09.015
- Jiang, P., Gan, M., Ebrahim, A. S., Castanedes-Casey, M., Dickson, D. W., y Yen, S. C. (2013). Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of  $\alpha$ -synuclein oligomers and decrease of neurites. *Neurobiology of Aging*, 34(5), 1504-1515. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.001
- Ju, T., Chen, H., Lin, J., Chang, C., Chang, W., Kang, J., . . . Chern, Y. (2011). Nuclear translocation of AMPK- $\alpha$ 1 potentiates striatal neurodegeneration in huntington's disease. *The Journal of Cell Biology*, 194(2), 209-227. doi:10.1083/jcb.201105010
- Kamalova, A., y Nakagawa, T. (2021). AMPA receptor structure and auxiliary subunits. *The Journal of Physiology*, 599(2), 453-469. doi:10.1113/JP278701
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1030-1038. doi:10.1126/science.1067020
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., y Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science* (5th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Kao, A. C. C., Harty, S., y Burnet, P. W. J. (2016). The influence of prebiotics on neurobiology and behavior. *International Review of Neurobiology*, 131, 21-48. doi:10.1016/bs.irn.2016.08.007
- Kessels, H. W., y Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, 61(3), 340-350. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.015
- Kim, C. H., Park, J., y Kim, M. (2014). Gut microbiota-derived short-chain fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Network*, 14(6), 277-288. doi:10.4110/in.2014.14.6.277
- Kim, H. J., Leeds, P., y Chuang, D. (2009). The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1226-1240. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06212x

- Kim, S., Lee, J., Chung, H., Song, J., Ha, J., y Bae, H. (2013). Neuroprotective effects of AMP-activated protein kinase on scopolamine induced memory impairment. *The Korean Journal of Physiology y Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 17(4), 331-338. doi:10.4196/kjpp.2013.17.4.331
- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R., y Igarashi, M. (2020). Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiological Reviews*, 100(1), 171-210. doi:10.1152/physrev.00041.2018
- Kintscher, U., y Law, R. E. (2005). PPAR $\gamma$ -mediated insulin sensitization: The importance of fat versus muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(2), E287-E291. doi:10.1152/ajpendo.00440.2004
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116-R1121. doi:10.1016/j.cub.2015.10.049
- Korzus, E., Rosenfeld, M. G., y Mayford, M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, 42(6), 961-972. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.002
- Kraeuter, A., Guest, P. C., y Sarnyai, Z. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 105-111. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2\_10
- Kwon, H. B., y Castillo, P. E. (2008). Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 57(1), 108–120. doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.024
- Layden, B. T., Angueira, A. R., Brodsky, M., Durai, V., y Lowe, W. L. (2013). Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets. *Translational Research*, 161(3), 131-140. doi:10.1016/j.trsl.2012.10.007
- Leal, G., Bramham, C. R., y Duarte, C. B. (2017). BDNF and hippocampal synaptic plasticity. *Vitamins and Hormones*, 104, 153-195. doi:10.1016/bs.vh.2016.10.004
- Lee, W. H., y Kim, S. G. (2010). AMPK-dependent metabolic regulation by PPAR agonists. *PPAR Research*, 2010 doi:10.1155/2010/549101
- Lee, H. K., y Kirkwood, A. (2011). AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Seminars in cell & developmental biology*, 22(5), 514–520. doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.06.007
- Lei, E., Vacy, K., y Boon, W. C. (2016). Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochemistry International*, 95, 75-84. doi:10.1016/j.neuint.2016.02.014
- Lessmann, V., y Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience research*, 65(1), 11–22. doi.org/10.1016/j.neures.2009.06.004

- Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., y Sweatt, J. D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40545-40559. doi:10.1074/jbc.M402229200
- Levy, W. B., y Steward, O. (1979). Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Research*, 175(2), 233-245. doi:10.1016/0006-8993(79)91003-5
- Li, G., Yao, W., y Jiang, H. (2014). Short-chain fatty acids enhance adipocyte differentiation in the stromal vascular fraction of porcine adipose tissue. *The Journal of nutrition*, 144(12), 1887–1895. doi.org/10.3945/jn.114.198531
- Li, J., Yu, R., Zhang, L., Wen, S., Wang, S., Zhang, X., . . . Kong, L. (2019). Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: A benefit of short-chain fatty acids. *Microbiome*, 7(1), 98. doi:10.1186/s40168-019-0713-7
- Li, W., Wu, X., Hu, X., Wang, T., Liang, S., Duan, Y., . . . Qin, B. (2017). Structural changes of gut microbiota in parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Science China. Life Sciences*, 60(11), 1223-1233. doi:10.1007/s11427-016-9001-4
- Li, Z., Yi, C., Katiraei, S., Kooijman, S., Zhou, E., Chung, C. K., . . . Wang, Y. (2018). Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut*, 67(7), 1269-1279. doi:10.1136/gutjnl-2017-314050
- Lin, H. V., Frassetto, A., Kowalik, J., Edward J, Nawrocki, A. R., Lu, M. M., Kosinski, J. R., . . . Marsh, D. J. (2012). Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PloS One*, 7(4), e35240. doi:10.1371/journal.pone.0035240
- Lisman, J., Yasuda, R., y Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(3), 169-182. doi:10.1038/nrn3192
- Liu, J., Wang, F., Liu, S., Du, J., Hu, X., Xiong, J., . . . Sun, J. (2017). Sodium butyrate exerts protective effect against parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon like peptide-1. *Journal of the Neurological Sciences*, 381, 176-181. doi:10.1016/j.jns.2017.08.3235
- Louis, P., y Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), 1-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x
- Lu, B., Nagappan, G., y Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220, 223-250. doi:10.1007/978-3-642-45106-5\_9
- Lüscher, C., y Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6) doi:10.1101/cshperspect.a005710

- Lynch, S. V., y Pedersen, O. (2016). The human intestinal microbiome in health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369-2379. doi:10.1056/NEJMra1600266
- Ma, T., Chen, Y., Vingtdeux, V., Zhao, H., Viollet, B., Marambaud, P., y Klann, E. (2014). Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid  $\beta$ . *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(36), 12230-12238. doi:10.1523/JNEUROSCI.1694-14.2014
- Malinow, R., y Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Annual review of neuroscience, 25, 103–126. doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758
- Maguire, E. A., Burgess, N., Donnett, J. G., Frackowiak, R. S., Frith, C. D., y O'Keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: A human navigation network. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5365), 921-924. doi:10.1126/science.280.5365.921
- Maqsood, R., y Stone, T. W. (2016). The gut-brain axis, BDNF, NMDA and CNS disorders. *Neurochemical Research*, 41(11), 2819-2835. doi:10.1007/s11064-016-2039-1
- Marinangeli, C., Didier, S., Ahmed, T., Caillerez, R., Domise, M., Laloux, C., . . . Vingtdeux, V. (2018). AMP-activated protein kinase is essential for the maintenance of energy levels during synaptic activation. *iScience*, 9, 1-13. doi:10.1016/j.isci.2018.10.006
- Marion-Letellier, R., Savoye, G., y Ghosh, S. (2016). Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European journal of pharmacology*, 785, 44–49. doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.004
- McNaughton, B. L., Douglas, R. M., y Goddard, G. V. (1978). Synaptic enhancement in fascia dentata: Cooperativity among coactive afferents. *Brain Research*, 157(2), 277-293. doi:10.1016/0006-8993(78)90030-6
- Medina, A. E., Liao, D. S., Mower, A. F., y Ramoa, A. S. (2001). Do NMDA receptor kinetics regulate the end of critical periods of plasticity? *Neuron*, 32(4), 553–555. doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00514-1
- Mehta, M. R., Barnes, C. A., y McNaughton, B. L. (1997). Experience-dependent, asymmetric expansion of hippocampal place fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8918-8921. doi:10.1073/pnas.94.16.8918
- Mehta, M. R., Quirk, M. C., y Wilson, M. A. (2000). Experience-dependent asymmetric shape of hippocampal receptive fields. *Neuron*, 25(3), 707-715. doi:10.1016/s0896-6273(00)81072-7
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 1007S-1015S. doi:10.1093/jn/130.4.1007S

- Miller, T. L., y Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1589-1592. doi:10.1128/aem.62.5.1589-1592.1996
- Mishra, J., Chaudhary, T., y Kumar, A. (2014). Rosiglitazone synergizes the neuroprotective effects of valproic acid against quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: Targeting PPAR $\gamma$  and HDAC pathways. *Neurotoxicity Research*, 26(2), 130-151. doi:10.1007/s12640-014-9458-z
- Miyamoto, J., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., Ichimura, A., Nakajima, A., y Kimura, I. (2016). Nutritional signaling via free fatty acid receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4) doi:10.3390/ijms17040450
- Miyoshi, M., Sakaki, H., Usami, M., Iizuka, N., Shuno, K., Aoyama, M., y Usami, Y. (2011). Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 30(2), 252–258. doi.org/10.1016/j.clnu.2010.09.012
- Moffat, S. D., Elkins, W., y Resnick, S. M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiology of Aging*, 27(7), 965-972. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.011
- Mohajeri, M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M., Faas, M., y Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: From basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition*, 57(Suppl 1), 1-14. doi:10.1007/s00394-018-1703-4
- Mohammadi-Farani, A., Pourmotabbed, A., y Ardeshirizadeh, Y. (2020). Effects of HDAC inhibitors on spatial memory and memory extinction in SPS-induced PTSD rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 241-248. doi:10.4103/1735-5362.288426
- Möhle, L., Mattei, D., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fischer, A., Alutis, M., . . . Wolf, S. A. (2016). Ly6C(hi) monocytes provide a link between antibiotic-induced changes in gut microbiota and adult hippocampal neurogenesis. *Cell Reports*, 15(9), 1945-1956. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.074
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., . . . Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5060), 1217-1221. doi:10.1126/science.256.5060.1217
- Morais, L. H., Schreiber, H. L., y Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(4), 241-255. doi:10.1038/s41579-020-00460-0
- Morellini, F. (2013). Spatial memory tasks in rodents: What do they model? *Cell and Tissue Research*, 354(1), 273-286. doi:10.1007/s00441-013-1668-9

- Moretti, M., Valvassori, S. S., Varela, R. B., Ferreira, C. L., Rochi, N., Benedet, J., . . . Quevedo, J. (2011). Behavioral and neurochemical effects of sodium butyrate in an animal model of mania. *Behavioural Pharmacology*, 22(8), 766-772. doi:10.1097/FBP.0b013e32834d0f1b
- Morrison, D. J., y Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189-200. doi:10.1080/19490976.2015.1134082
- Moser, M., Rowland, D. C., y Moser, E. I. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a021808. doi:10.1101/cshperspect.a021808
- Murakoshi, H., Shin, M. E., Parra-Bueno, P., Szatmari, E. M., Shibata, A. C. E., y Yasuda, R. (2017). Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. *Neuron*, 94(1), 37-47.e5. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.036
- Nadel, L., O'Keefe, J., y Black, A. (1975). Slam on the brakes: A critique of altman, brunner, and bayer's response-inhibition model of hippocampal function. *Behavioral Biology*, 14(2), 151-162. doi:10.1016/s0091-6773(75)90148-0
- Naranjo, V., Contreras, A., Merino, B., Plaza, A., Lorenzo, M. P., García-Cáceres, C., . . . Cano, V. (2020). Specific deletion of the astrocyte leptin receptor induces changes in hippocampus glutamate metabolism, synaptic transmission and plasticity. *Neuroscience*, 447, 182-190. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.10.005
- Nepelska, M., de Wouters, T., Jacouton, E., Béguet-Crespel, F., Lapaque, N., Doré, J., . . . Blottière, H. M. (2017). Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPAR $\gamma$  transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports*, 7, 43199. doi:10.1038/srep43199
- Neves, G., Cooke, S. F., y Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 65-75. doi:10.1038/nrn2303
- Neyman, S., y Manahan-Vaughan, D. (2008). Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *The European journal of neuroscience*, 27(6), 1345-1352. doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06109x
- Nguyen, P. V., y Kandel, E. R. (1996). A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(10), 3189-3198.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B., y Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 100(4), 656-664. doi:10.1016/j.pbb.2011.08.008

- Nicoll, R. A., y Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(11), 863-876. doi:10.1038/nrn1786
- Nøhr, M. K., Egerod, K. L., Christiansen, S. H., Gille, A., Offermanns, S., Schwartz, T. W., y Møller, M. (2015). Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience*, 290, 126-137. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.040
- Nøhr, M. K., Pedersen, M. H., Gille, A., Egerod, K. L., Engelstoft, M. S., Husted, A. S., . . . Schwartz, T. W. (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology*, 154(10), 3552-3564. doi:10.1210/en.2013-1142
- Norris, D. (2017). Short-term memory and long-term memory are still different. *Psychological Bulletin*, 143(9), 992-1009. doi:10.1037/bul0000108
- O'Connor, J. J., Rowan, M. J., y Anwyl, R. (1995). Tetanically induced LTP involves a similar increase in the AMPA and NMDA receptor components of the excitatory postsynaptic current: investigations of the involvement of mGlu receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 1), 2013–2020. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-02013.1995
- O'Keefe, J., y Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map* Oxford: Clarendon Press.
- Okano, H., Hirano, T., y Balaban, E. (2000). Learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12403-12404. doi:10.1073/pnas.210381897
- O'Keefe, J., y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171-175. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1
- Oldendorf, W. H. (1973). Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. *The American Journal of Physiology*, 224(6), 1450-1453. doi:10.1152/ajplegacy.1973.224.6.1450
- Oleskin, A. V., y Shenderov, B. A. (2016). Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 27, 30971. doi:10.3402/mehd.v27.30971
- Olton, D. S., y Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), 669-682. doi:10.1016/0028-3932(79)90042-3
- Olton, D. S., y Samuelson, R. J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(2), 97-116. doi:10.1037/0097-7403.2.2.97

- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32-48. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.027
- Ormerod, B. K., Hanft, S. J., Asokan, A., Haditsch, U., Lee, S. W., y Palmer, T. D. (2013). PPAR $\gamma$  activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain, Behavior, and Immunity*, 29, 28-38. doi:10.1016/j.bbi.2012.10.017
- Paiva, I., Pinho, R., Pavlou, M. A., Hennion, M., Wales, P., Schütz, A., . . . Outeiro, T. F. (2017). Sodium butyrate rescues dopaminergic cells from alpha-synuclein-induced transcriptional deregulation and DNA damage. *Human Molecular Genetics*, 26(12), 2231-2246. doi:10.1093/hmg/ddx114
- Paoletti, P., Bellone, C., y Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(6), 383-400. doi:10.1038/nrn3504
- Paparo, L., Nocerino, R., Ciaglia, E., Di Scala, C., De Caro, C., Russo, R., Trinchese, G., Aitoro, R., Amoroso, A., Bruno, C., Di Costanzo, M., Passariello, A., Messina, F., Agangi, A., Napolitano, M., Voto, L., Gatta, G. D., Pisapia, L., Montella, F., Mollica, M. P., ... Berni Canani, R. (2021). Butyrate as a bioactive human milk protective component against food allergy. *Allergy*, 76(5), 1398–1415. doi.org/10.1111/all.14625
- Park, D., Bae, S., Yoon, T. H., y Ko, J. (2018). Molecular mechanisms of synaptic specificity: Spotlight on hippocampal and cerebellar synapse organizers. *Molecules and Cells*, 41(5), 373-380. doi:10.14348/molcells.2018.0081
- Park, H., y Poo, M. M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(1), 7–23. doi.org/10.1038/nrn3379
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., y Sacktor, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), 1141-1144. doi:10.1126/science.1128657
- Patnala, R., Arumugam, T. V., Gupta, N., y Dheen, S. T. (2017). HDAC inhibitor sodium butyrate-mediated epigenetic regulation enhances neuroprotective function of microglia during ischemic stroke. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6391-6411. doi:10.1007/s12035-016-0149-z
- Pelgrim, C. E., Franx, B. A. A., Snabel, J., Kleemann, R., Arnoldussen, I. A. C., y Kiliaan, A. J. (2017). Butyrate reduces HFD-induced adipocyte hypertrophy and metabolic risk factors in obese LDLr $^{-/-}$ .leiden mice. *Nutrients*, 9(7) doi:10.3390/nu9070714
- Penn, A. C., Zhang, C. L., Georges, F., Royer, L., Breillat, C., Hosy, E., Petersen, J. D., Humeau, Y., y Choquet, D. (2017). Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature*, 549(7672), 384–388. doi.org/10.1038/nature23658

- Piber, D., Nowacki, J., Mueller, S. C., Wingenfeld, K., y Otte, C. (2018). Sex effects on spatial learning but not on spatial memory retrieval in healthy young adults. *Behavioural Brain Research*, 336, 44-50. doi:10.1016/j.bbr.2017.08.034
- Plaza, A., Antonazzi, M., Blanco-Urgoiti, J., Del Olmo, N., y Ruiz-Gayo, M. (2019). Potential role of leptin in cardiac steatosis induced by highly saturated fat intake during adolescence. *Molecular Nutrition y Food Research*, 63(19), e1900110. doi:10.1002/mnfr.201900110
- Portero-Tresserra, M., Del Olmo, N., Martí-Nicolovius, M., Guillazo-Blanch, G., y Vale-Martínez, A. (2014). D-cycloserine prevents relational memory deficits and suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in the hippocampus. *European Neuropsychopharmacology*, 24(11), 1798-1807. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.10.002
- Potter, W. B., O'Riordan, K. J., Barnett, D., Osting, S. M. K., Wagoner, M., Burger, C., y Roopra, A. (2010). Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PLoS One*, 5(2), e8996. doi:10.1371/journal.pone.0008996
- Preston-Ferrer, P., y Burgalossi, A. (2018). Linking neuronal structure to function in rodent hippocampus: A methodological prospective. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 605-618. doi:10.1007/s00441-017-2732-7
- Rashtiani, S., Goudarzi, I., Jafari, A., y Rohampour, K. (2021). Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) is essential for the memory improving effect of adiponectin. *Neuroscience Letters*, 749, 135721. doi:10.1016/j.neulet.2021.135721
- Raymond, C. R., y Redman, S. J. (2006). Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 570(Pt 1), 97-111. doi:10.1113/jphysiol.2005.098947
- Ricciarelli, R., Brullo, C., Prickaerts, J., Arancio, O., Villa, C., Rebosio, C., . . . Fedele, E. (2017). Memory-enhancing effects of GEBR-32a, a new PDE4D inhibitor holding promise for the treatment of alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/srep46320
- Rolls, E. T. (2018). The storage and recall of memories in the hippocampo-cortical system. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 577-604. doi:10.1007/s00441-017-2744-3
- Romo-Araiza, A., Gutiérrez-Salmeán, G., Galván, E. J., Hernández-Frausto, M., Herrera-López, G., Romo-Parra, H., . . . Ibarra, A. (2018). Probiotics and prebiotics as a therapeutic strategy to improve memory in a model of middle-aged rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 416. doi:10.3389/fnagi.2018.00416
- Rudy, J. W. (2009). Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learning y Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(10), 573-585. doi:10.1101/lm.1494409
- Sacktor, T. C., y Fenton, A. A. (2018). What does LTP tell us about the roles of CaMKII and PKM $\zeta$  in memory? *Molecular Brain*, 11(1), 77. doi:10.1186/s13041-018-0420-5

- Sala, C., y Segal, M. (2014). Dendritic spines: The locus of structural and functional plasticity. *Physiological Reviews*, *94*(1), 141-188. doi:10.1152/physrev.00012.2013
- Sánchez, G., de Oliveira Alvares, L., Oberholzer, M. V., Genro, B., Quillfeldt, J., Costa da Costa, J., . . . Kornisiuk, E. (2009). M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(3), 691-700. doi:10.1002/jnr.21876
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., y Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *19*(1), 62-75. doi:10.1177/1073858411435129
- Sato, F. T., Yap, Y. A., Crisma, A. R., Portovedo, M., Murata, G. M., Hirabara, S. M., . . . Vinolo, M. A. R. (2020). Tributyrin attenuates metabolic and inflammatory changes associated with obesity through a GPR109A-dependent mechanism. *Cells*, *9*(9) doi:10.3390/cells9092007
- Savignac, H. M., Corona, G., Mills, H., Chen, L., Spencer, J. P. E., Tzortzis, G., y Burnet, P. W. J. (2013). Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. *Neurochemistry International*, *63*(8), 756-764. doi:10.1016/j.neuint.2013.10.006
- Schönfeld, P., y Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, *57*(6), 943-954. doi:10.1194/jlr.R067629
- Schröder, C., Eckert, K., y Maurer, H. R. (1998). Tributyrin induces growth inhibitory and differentiating effects on HT-29 colon cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology*, *13*(6), 1335-1340. doi:10.3892/ijo.13.6.1335
- Schultz, C., y Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, *34*, 6-17. doi:10.1159/000360925
- Scoville, W. B., y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *20*(1), 11-21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11
- Seok, H., Lee, M., Shin, E., Yun, M. R., Lee, Y., Moon, J. H., . . . Cha, B. S. (2019). Low-dose pioglitazone can ameliorate learning and memory impairment in a mouse model of dementia by increasing LRP1 expression in the hippocampus. *Scientific Reports*, *9*(1), 4414. doi:10.1038/s41598-019-40736-x
- Sherwin, E., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2018). Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1420*(1), 5-25. doi:10.1111/nyas.13416
- Silva, Y. P., Bernardi, A., y Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, *11*, 25. doi:10.3389/fendo.2020.00025

- Skonieczna-Żydecka, K., Grochans, E., Maciejewska, D., Szkup, M., Schneider-Matyka, D., Jurczak, A., . . . Stachowska, E. (2018). Faecal short chain fatty acids profile is changed in polish depressive women. *Nutrients*, *10*(12) doi:10.3390/nu10121939
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., . . . Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6145), 569-573. doi:10.1126/science.1241165
- Schmittgen, T. D., y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, *3*(6), 1101–1108. doi.org/10.1038/nprot.2008.73
- Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R., y Bear, M. F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nature neuroscience*, *4*(11), 1079–1085. doi.org/10.1038/nn746
- Soliman, M. L., Combs, C. K., y Rosenberger, T. A. (2013). Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, *8*(1), 287-300. doi:10.1007/s11481-012-9426-4
- Squire, L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, *61*(1), 6-9. doi:10.1016/j.neuron.2008.12.023
- Squire, L. R., y Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5026), 1380-1386. doi:10.1126/science.1896849
- Steckert, A. V., Comim, C. M., Igna, D. M. D., Dominguni, D., Mendonça, B. P., Ornell, F., . . . Dal-Pizzol, F. (2015). Effects of sodium butyrate on aversive memory in rats submitted to sepsis. *Neuroscience Letters*, *595*, 134-138. doi:10.1016/j.neulet.2015.04.019
- Stilling, R. M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*, *99*, 110-132. doi.org/10.1016/j.neuint.2016.06.011
- Strehlow, V., Heyne, H. O., Vlaskamp, D. R. M., Marwick, K. F. M., Rudolf, G., de Bellescize, J., . . . Lemke, J. R. (2019). GRIN2A-related disorders: Genotype and functional consequence predict phenotype. *Brain: A Journal of Neurology*, *142*(1), 80-92. doi:10.1093/brain/awy304
- Su, J., Zhang, N., y Ho, P. C. (2004). Determination of tributyrin and its metabolite butyrate in wistar rat plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *18*(19), 2217-2222. doi:10.1002/rcm.1607
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X., . . . Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, *558*(Pt 1), 263-275. doi:10.1113/jphysiol.2004.063388

- Sun, J., Wang, F., Hong, G., Pang, M., Xu, H., Li, H., . . . Liu, J. (2016). Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience Letters*, *618*, 159-166. doi:10.1016/j.neulet.2016.03.003
- Sweatt, J. D. (2016). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *Journal of Neurochemistry*, *139 Suppl 2*, 179-199. doi:10.1111/jnc.13580
- Szklany, K., Wopereis, H., de Waard, C., van Wageningen, T., An, R., van Limpt, K., . . . Kraneveld, A. D. (2020). Supplementation of dietary non-digestible oligosaccharides from birth onwards improve social and reduce anxiety-like behaviour in male BALB/c mice. *Nutritional Neuroscience*, *23(11)*, 896-910. doi:10.1080/1028415X.2019.1576362
- Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neuroscience Research*, *84*, 27-33. doi:10.1016/j.neures.2014.02.012
- Tarantino, G. (2014). Gut microbiome, obesity-related comorbidities, and low-grade chronic inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99(7)*, 2343-2346. doi:10.1210/jc.2014-2074
- Thornton, C., Sardini, A., y Carling, D. (2008). Muscarinic receptor activation of AMP-activated protein kinase inhibits orexigenic neuropeptide mRNA expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *283(25)*, 17116-17122. doi:10.1074/jbc.M708987200
- Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, *55(4)*, 189-208. doi:10.1037/h0061626
- Topuz, R. D., Gunduz, O., Tastekin, E., y Karadag, C. H. (2020). Effects of hippocampal histone acetylation and HDAC inhibition on spatial learning and memory in the morris water maze in rats. *Fundamental y Clinical Pharmacology*, *34(2)*, 222-228. doi:10.1111/fcp.12512
- Torres-Fuentes, C., Golubeva, A. V., Zhdanov, A. V., Wallace, S., Arboleya, S., Papkovsky, D. B., . . . Schellekens, H. (2019). Short-chain fatty acids and microbiota metabolites attenuate ghrelin receptor signaling. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33(12)*, 13546-13559. doi:10.1096/fj.201901433R
- Track, N. S., Cawkwell, M. E., Chin, B. C., Chiu, S. S., Haberer, S. A., y Honey, C. R. (1985). Guar gum consumption in adolescent and adult rats: short- and long-term metabolic effects. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *63(9)*, 1113-1121. doi.org/10.1139/y85-183
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., . . . Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, *62(3)*, 405-496. doi:10.1124/pr.109.002451

- Valladolid-Acebes, I., Merino, B., Principato, A., Fole, A., Barbas, C., Lorenzo, M. P., . . . Cano, V. (2012). High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 302(4), E396-E402. doi:10.1152/ajpendo.00343.2011
- Valladolid-Acebes, I., Stucchi, P., Cano, V., Fernández-Alfonso, M. S., Merino, B., Gil-Ortega, M., . . . Olmo, N. D. (2011). High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(1), 80-85. doi:10.1016/j.nlm.2010.11.007
- Valladolid-Acebes, I., Fole, A., Martín, M., Morales, L., Cano, M. V., Ruiz-Gayo, M., y Del Olmo, N. (2013). Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin?. *Neurobiology of learning and memory*, 106, 18–25. doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.012
- Val-Laillet, D., Guérin, S., Coquery, N., Nogret, I., Formal, M., Romé, V., . . . Segain, J. (2018). Oral sodium butyrate impacts brain metabolism and hippocampal neurogenesis, with limited effects on gut anatomy and function in pigs. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(4), 2160-2171. doi:10.1096/fj.201700547RR
- Valvassori, S. S., Dal-Pont, G. C., Steckert, A. V., Varela, R. B., Lopes-Borges, J., Mariot, E., . . . Quevedo, J. (2016). Sodium butyrate has an antimanic effect and protects the brain against oxidative stress in an animal model of mania induced by ouabain. *Psychiatry Research*, 235, 154-159. doi:10.1016/j.psychres.2015.11.017
- Valvassori, S. S., Resende, W. R., Budni, J., Dal-Pont, G. C., Bavaresco, D. V., Réus, G. Z., . . . Quevedo, J. (2015). Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, reverses behavioral and mitochondrial alterations in animal models of depression induced by early- or late-life stress. *Current Neurovascular Research*, 12(4), 312-320. doi:10.2174/156720261266615072812121
- Varela, R. B., Valvassori, S. S., Lopes-Borges, J., Mariot, E., Dal-Pont, G. C., Amboni, R. T., . . . Quevedo, J. (2015). Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of wistar rats. *Journal of Psychiatric Research*, 61, 114-121. doi:10.1016/j.jpsychires.2014.11.003
- Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. A., Attner, M. A., . . . Wood, M. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(23), 6128-6140. doi:10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007
- Vijay, N., y Morris, M. E. (2014). Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Current Pharmaceutical Design*, 20(10), 1487-1498. doi:10.2174/13816128113199990462

- Villapol, S. (2018). Roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on brain and peripheral inflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(1), 121-132. doi:10.1007/s10571-017-0554-5
- Vingtdeux, V., Chandakkar, P., Zhao, H., d'Abramo, C., Davies, P., y Marambaud, P. (2011). Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid- $\beta$  peptide degradation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1), 219-231. doi:10.1096/fj.10-167361
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., y Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3(10), 858-876. doi:10.3390/nu3100858
- Vinolo, M. A., Hirabara, S. M., y Curi, R. (2012). G-protein-coupled receptors as fat sensors. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 15(2), 112-116. doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834f4598
- Vogel, C., y Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews. Genetics*, 13(4), 227-232. doi:10.1038/nrg3185
- von Bernhardt, R., Bernhardt, L. E., y Eugenín, J. (2017). What is neural plasticity? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1015, 1-15. doi:10.1007/978-3-319-62817-2\_1
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., . . . Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, 63(Suppl 1), 191. doi:10.33549/physiolres.932678
- Wang, H., Huang, B., Wang, W., Li, J., Chen, Y., Flynn, T., . . . Yang, B. (2019). High urea induces depression and LTP impairment through mTOR signalling suppression caused by carbamylation. *EBioMedicine*, 48, 478-490. doi:10.1016/j.ebiom.2019.09.049
- Wang, H., Ardiles, A. O., Yang, S., Tran, T., Posada-Duque, R., Valdivia, G., . . . Kirkwood, A. (2016). Metabotropic glutamate receptors induce a form of LTP controlled by translation and arc signaling in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(5), 1723-1729. doi:10.1523/JNEUROSCI.0878-15.2016
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., y Conlon, M. A. (2012). Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(8), 2096-2102. doi:10.1007/s10620-012-2167-7
- Wang, P., Zhang, Y., Gong, Y., Yang, R., Chen, Z., Hu, W., . . . Huang, C. (2018). Sodium butyrate triggers a functional elongation of microglial process via akt-small RhoGTPase activation and HDACs inhibition. *Neurobiology of Disease*, 111, 12-25. doi:10.1016/j.nbd.2017.12.006

- Wang, Y., Wang, Z., Wang, Y., Li, F., Jia, J., Song, X., . . . Wang, Y. (2018). The gut-microglia connection: Implications for central nervous system diseases. *Frontiers in Immunology*, 0 doi:10.3389/fimmu.2018.02325
- Wei, Y., Melas, P. A., Wegener, G., Mathé, A. A., y Lavebratt, C. (2014). Antidepressant-like effect of sodium butyrate is associated with an increase in TET1 and in 5-hydroxymethylation levels in the bdnf gene. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(2) doi:10.1093/ijnp/pyu032
- Wouters, M. M., Gibbons, S. J., Roeder, J. L., Distad, M., Ou, Y., Strege, P. R., . . . Farrugia, G. (2007). Exogenous serotonin regulates proliferation of interstitial cells of cajal in mouse jejunum through 5-HT2B receptors. *Gastroenterology*, 133(3), 897-906. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.017
- Xiang, G. Q., Tang, S. S., Jiang, L. Y., Hong, H., Li, Q., Wang, C., . . . Yin, L. (2012). PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(4), 589-596. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01432x
- Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., y Kadowaki, T. (2014). Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 28(1), 15–23. doi.org/10.1016/j.beem.2013.09.003
- Yamawaki, Y., Yoshioka, N., Nozaki, K., Ito, H., Oda, K., Harada, K., . . . Akagi, H. (2018). Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Research*, 1680, 13-38. doi:10.1016/j.brainres.2017.12.004
- Zhang, D., Wang, X., y Lu, X. (2016). Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice. *Endocrinology*, 157(7), 2853-2869. doi:10.1210/en.2015-2078
- Zhong, T., Qing, Q. J., Yang, Y., Zou, W. Y., Ye, Z., Yan, J. Q., y Guo, Q. L. (2014). Repression of contextual fear memory induced by isoflurane is accompanied by reduction in histone acetylation and rescued by sodium butyrate. *British Journal of Anaesthesia*, 113(4), 634-643. doi:10.1093/bja/aeu184
- Zhou, L., Chen, T., Li, G., Wu, C., Wang, C., Li, L., . . . Chen, L. (2016). Activation of PPAR $\gamma$  ameliorates spatial cognitive deficits through restoring expression of AMPA receptors in seipin knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 36(4), 1242-1253.
- Zimmermann, T., Bartsch, J. C., Beer, A., Lomazzo, E., Guggenhuber, S., Lange, M. D., . . . Lutz, B. (2019). Impaired anandamide/palmitoylethanolamide signaling in hippocampal glutamatergic neurons alters synaptic plasticity, learning, and emotional responses. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(8), 1377-1388. doi:10.1038/s41386-018-0274-7