

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



GRADO EN PSICOLOGÍA

2019-2020

**ACTIVIDAD METABÓLICA HIPOCAMPAL Y
MEMORIA DE TRABAJO EN RATAS CON
ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO
ALCOHÓLICO**

**HIPPOCAMPAL METABOLIC ACTIVITY AND
WORKING MEMORY IN RATS WITH NON-
ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE**

Trabajo empírico

DUMITRU OCUNTSCHI

Oviedo, Julio de 2020

Resumen

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es una enfermedad altamente prevalente en la sociedad actual que puede avanzar hacia estadios más graves, como la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), perjudicando tanto la salud física como la mental, afectando a nivel cognitivo a través de la relación entre la microbiota intestinal y el encéfalo. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de dicha enfermedad, tanto a nivel conductual, como a nivel de metabolismo energético hipocampal. Para ello se ha inducido EHNA, a través de una dieta alta en grasa y colesterol, en 7 ratas macho (*Sprague-Dawley*), que fueron comparadas con otras 7 ratas con dieta control en una tarea de memoria de trabajo espacial realizada en el laberinto acuático de brazos radiales, mientras que la actividad metabólica del hipocampo y sus capas se evaluó por medio de la técnica histoquímica de la citocromo c-oxidasa. Las ratas con EHNA han presentado déficits en el aprendizaje de la tarea espacial, pero no se han encontrado diferencias significativas en la actividad metabólica del hipocampo, sugiriendo ello que estos déficits no parecen implicar a la formación hipocampal, sino más bien a otras estructuras con él relacionadas, ya bien sean estas corticales o subcorticales, y que futuros estudios deberán de discernir.

Palabras clave: Esteatohepatitis no alcohólica, memoria de trabajo espacial, citocromo c oxidasa, dieta alta en grasa y colesterol, hipocampo.

Índice de abreviaturas: EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólico; RAWM: del inglés “radial arm water maze”; CCO: citocromo c oxidasa; CA: cuerno de Ammon; DG: giro dentado; DC: dieta control; DAGC: dieta alta en grasa y colesterol; Lac. mol.: Lacunosum-molecular; mol: molecular

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease is a highly prevalent disease in today's society that can advance towards more serious stages, such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), damaging both physical and mental health, affecting cognition through the relationship between intestinal microbiota and brain. The objective of this work was to study the effects of this disease, both at the behavioral and hippocampal brain energy metabolism. Therefore, through a high fat and cholesterol diet, NASH has been induced in 7 male rats (*Sprague-Dawley*), which were compared with 7 other rats with a control diet. They were evaluated in a spatial working memory task carried out in the radial arm water maze, while the metabolic activity of the hippocampus and its layers were examined by means of cytochrome c oxidase histochemistry. The rats with NASH have showed deficits in learning the spatial task, but no significant differences were found in the metabolic activity of the hippocampus, suggesting that these deficits do not seem to imply the hippocampal formation, but rather other related structures, either cortical or subcortical, a relation that future studies should discern.

Keywords: Non-alcoholic steatohepatitis, spatial working memory, cytochrome c oxidase, high-fat/high-cholesterol diet, hippocampus.

1. Introducción

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (HGNA) es definida por la presencia de más del 5% de esteatosis, es decir, una acumulación anormal de gotas de grasa en las células del hígado (hepatocitos), cuyo contenido es rico en triglicéridos y que es producida en ausencia de consumo excesivo de alcohol, así como de otras etiologías reconocidas del hígado graso (Younossi et al., 2016).

Se trata pues de una enfermedad muy distribuida a lo largo del mundo, con una prevalencia del 25% en la población mundial, llegando al 31% en América del Sur y al 32% en Oriente Medio, mientras que en Europa y Norteamérica se encuentra en torno al 24% (Younossi et al., 2016). Además, la enfermedad de HGNA muestra un aumento del 10% de la prevalencia global entre el 2005, cuando solo era del 15%, y el 2015, llegando en este momento a prevalencias cercanas al 25% (Younossi et al., 2016).

En algunos casos, la enfermedad de HGNA puede avanzar hacia estadios más graves, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Las características patológicas de la EHNA incluyen, además de la esteatosis, el daño hepático, inflamación y varios niveles de fibrosis (Liu, Baker, Bhatia, Zhu y Baker, 2016). Además, parte de los pacientes afectados puede desarrollar cirrosis e incluso carcinoma celular (Vernon, Baranova y Younossi, 2011; European Association for the Study of The Liver [EASL] y European Association for the Study of Diabetes [EASD], 2016). Este curso de la enfermedad está relacionado con una elevada mortalidad, entre el 12% y el 25%, en un plazo de 7 a 10 años (Farrell y Larter, 2006). Por otra parte, la EHNA se encuentra aproximadamente en el 59% de los pacientes con HGNA, si bien es cierto e importante destacar que los datos pueden estar sesgados debido a la selección de los pacientes en función de la sospecha de tener EHNA. Teniendo esto presente, se estima que la prevalencia de la EHNA en la población general se encuentra entre el 1,5% y el 6,45% (Younossi et al., 2016).

Tanto la enfermedad del HGNA como su progresión más grave, la EHNA, presentan una alta comorbilidad con otras patologías como la diabetes, la obesidad, el síndrome metabólico y/o las enfermedades cardiovasculares (Younossi et al., 2016; Anstee, Targher y Day, 2013; Mavrogiannaki y Migdalis, 2013). Además, dichas enfermedades muestran un importante impacto en la calidad de vida de las personas

afectadas, pudiendo dar lugar a un peor funcionamiento tanto físico, como emocional y social (Golabi et al., 2016).

Existen múltiples factores que pueden promover la manifestación de estas enfermedades, teniendo el consumo de dietas altas en grasas y colesterol, una gran importancia (Thomsen et al., 2014; Higarza et al., 2019). Esto es debido a que el aporte excesivo de ácidos grasos provoca una mayor acumulación de triglicéridos en el hígado, dando ello lugar a una afectación en la regulación de la insulina, algo que puede generar una resistencia a la misma, y que puede traducirse en la concentración de glucosa en sangre (Jiang et al., 2019). Este desajuste hormonal favorece la síntesis lipídica en el hígado, a la vez que dificulta la oxidación de los ácidos grasos (Jiang et al., 2019). La acumulación de triglicéridos, por si sola, no resulta dañina, pero la resistencia a la insulina también favorece la acumulación de tipos de grasas tóxicas para la célula en el citoplasma de los hepatocitos, como puede ser el colesterol libre (Van Rooyen et al., 2011; Armesto et al., 2011). Esto provoca la rotura celular, que a su vez puede traducirse en una respuesta inflamatoria y perpetúa el daño a otras células, al liberarse las sustancias tóxicas (Jiang et al., 2019). Todo este proceso sería el que da lugar a la enfermedad de HGNA y su forma más grave, la EHNA (Jiang et al., 2019). Además, es importante conocer como otros factores muestran un elevado impacto, tales como el sedentarismo, ya que el ejercicio físico modula el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Oliveira de Lima Sanches, de Abreu-Silva y Marcadenti, 2016) o incluso la genética (Eslam, Valenti y Romeo, 2018).

Tanto el HGNA como la EHNA dan lugar a una disbiosis en el intestino, es decir, el desbalance de los microorganismos que lo habitan por una alteración en la microbiota intestinal. Esto ocurre porque existe una estrecha interacción entre el intestino y el hígado, pues ambos participan en el metabolismo de los nutrientes. Debido al daño hepático, a la respuesta inflamatoria del mismo y su menor capacidad para procesar las distintas moléculas que recibe, acaba repercutiendo en la membrana intestinal y en su permeabilidad, alterando el frágil equilibrio existente en su microbiota (Gómez-Cortés et al., 2015).

Además, existe una compleja interacción que pone en relación, no solo al intestino con el hígado, sino añadiéndose un tercer órgano: el encéfalo. Esta comunicación se

establece por varias vías, las cuales son el nervio vago, pues se ha demostrado que el daño en éste impide la expresión de ciertos efectos bacterianos (Dinan y Cryan, 2017); la producción, por parte de la microbiota intestinal, de neurotransmisores que pueden afectar al sistema nervioso autónomo (Mayer, Tillisch y Gupta, 2015); las células inmunitarias, que producen citocinas, proteínas usadas para la comunicación intercelular que pueden llegar a atravesar las barreras encefálicas y afectarlo directamente (Mayer et al., 2015); y los cambios metabólicos originados por alteraciones en la microbiota (Mayer et al., 2015). En consecuencia, estas enfermedades pueden resultar en una afectación del encéfalo, pudiendo ello dar lugar a determinados déficits emocionales y/o cognitivos (Kim et al., 2016; Higarza et al., 2019).

En relación con las alteraciones emocionales, algunos estudios han señalado que sujetos con HGNA, el estadio previo a desarrollar EHNA, tienen más probabilidad de padecer trastornos depresivos, en comparación con otras enfermedades del hígado y con la población que no presenta patologías (Weinstein et al., 2011), existiendo asimismo evidencias de que esta enfermedad, el HGNA, correlaciona con apatía (Moretti, Caruso y Gazzin, 2019). Sin embargo, esto no es consistente en la literatura presente, ya que existen estudios que no encuentran una relación fuerte entre ambas enfermedades (Lee, Otgonsuren, Younoszai y Younossi, 2013), mientras otros artículos proponen que la relación entre ambas no es mayor que la que se encuentra entre la depresión y otras enfermedades crónicas del hígado (Macavei, Baban y Dumitrascu, 2015). En cuanto a la relación entre ansiedad y HGNA, se obtienen resultados parcialmente similares: no existe una mayor relación encontrada entre trastornos de ansiedad e HGNA, respecto a otras enfermedades crónicas del hígado (Macavei et al., 2015). Por otra parte, estudios en modelos animales han mostrado como la dieta occidental, caracterizada por una alta cantidad de grasas y colesterol, que da lugar al desarrollo de HGNA, se relaciona con conductas de tipo autista en ratas, como la evitación social de congéneres (Veniaminova et al., 2017). En referencia al posible impacto que puede tener la enfermedad de HGNA y EHNA en la función cognitiva, algunos estudios en población humana señalan que estas enfermedades se relacionan con peores puntuaciones en test cognitivos y disfunciones cognitivas leves (Seo et al., 2016; Filipović, Marković, Durić y Filipović, 2018), sobre todo en funciones ejecutivas y las habilidades visoespaciales (Celikbilek, Celikbilek y Bozkurt, 2018). Además, existe una correlación negativa entre las

puntuaciones obtenidas en las pruebas cognitivas y el nivel de fibrosis, es decir, la gravedad de la enfermedad, aunque no así con el grado de esteatosis hepática (Celikbilek et al., 2018). En consecuencia, existen algunos estudios que han tratado de explorar estas posibles alteraciones en la función cognitiva en modelos animales, observando alteraciones en la tarea de memoria de trabajo espacial, en roedores a los que se les indujo una dieta alta en grasa y colesterol (Chen et al., 2019; Higarza et al., 2019), siendo aún bastante limitada la cantidad de trabajos focalizados en estudiar las posibles alteraciones cognitivas que pueden subyacer al HGNA y/o la EHNA.

La memoria de trabajo es un tipo de memoria a corto plazo que se caracteriza por el mantenimiento y manipulación de la información durante un periodo limitado de tiempo (Baddeley, 1992). Así, la memoria de trabajo forma parte de las funciones ejecutivas y proporciona un almacenamiento temporal de la información necesaria para realizar tareas más complejas, como el lenguaje, la planificación u organización, la comprensión, el aprendizaje y el razonamiento (Baddeley y Hitch, 1974). Una manera de explorar la memoria de trabajo en roedores es mediante el estudio de la memoria de trabajo espacial, la cual realiza la codificación de información contextual específica del espacio que nos rodea, clave para la orientación y el aprendizaje (Olton, Collison y Werz, 1977). Para evaluar la memoria de trabajo espacial, ha sido ampliamente usado el laberinto radial (Olton y Samuelson, 1976) y el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984), así como la combinación de ambos, el laberinto acuático de brazos radiales (RAWM, por sus siglas en inglés), el cual permite juntar la complejidad espacial de los laberintos radiales, junto con el rápido aprendizaje y la alta motivación por escapar que subyace a las tareas de memoria espacial realizadas en el laberinto acuático de Morris (Alamed, Wilcock, Diamond, Gordon y Morgan, 2006).

La principal región cerebral moduladora de la memoria de trabajo es la corteza prefrontal (Funahashi y Kubota, 1994). Sin embargo, para su correcta ejecución, puede precisar asimismo de otras regiones que conforman el sistema límbico (Méndez et al., 2008; Méndez-López, Méndez, López y Arias, 2009). El hipocampo, estructura subcortical que, en humanos, se encuentra en el lóbulo temporal medial y forma parte del sistema límbico, se encuentra involucrado en conductas que requieren de memoria de trabajo, sean o no de tipo espacial (Olton, Becker y Handelman, 1979; Olton y Paras, 1979).

El hipocampo, sin embargo, no se trata de una estructura homogénea anatómica y funcionalmente, sino que se subdivide en distintas capas, atendiendo a una morfología y funcionalidad diferencial. Por una parte, contamos con el Cuerno de Ammon (CA), que se subdivide en 4 regiones, CA1, CA2, CA3 y CA4; y por otra parte la circunvolución o giro dentado (DG) (Bear, Connors y Paradiso, 2020). Estas capas interactúan y pueden trabajar de manera conjunta, aunque también pueden tener funciones específicas independientes y distinta implicación en el aprendizaje y la memoria, donde cobran especial importancia CA1, CA3 y DG, así como en la realización de las tareas de memoria de trabajo (Kesner, Lee y Gilbert, 2004). Estas cuatro subregiones se encuentran comunicadas por lo que se conoce como el circuito trisináptico, que consta, como su propio nombre indica, de tres conexiones sinápticas, partiendo de la corteza entorrinal, que envía información al DG, este a su vez conecta con CA3, y CA3 se proyecta mayormente hacia CA1 (Bear et al., 2020). El DG posee diversas funciones, como la codificación conjunta de la información proveniente de múltiples aferencias sensoriales, la separación espacial de patrones, que consiste en la habilidad para discriminar entre localizaciones espaciales muy próximas entre sí, y la facilitación de la codificación de la información espacial (Rolls y Kesner, 2006; Kesner, Morris y Weeden, 2012; Morris, Churchwell, Kesner y Gilbert, 2012). Además, junto a CA3, también es clave para la detección de novedad espacial (Lee, Hunsaker y Kesner, 2005), y generar representaciones métricas que se proyectarán a CA1 y a CA3 (Goodrich-Hunsaker, Hunsaker y Kesner, 2008). Por otra parte, CA3 también se sitúa como una región clave en la codificación de información espacial, la separación de patrones y en asociaciones arbitrarias, es decir, relacionar información de distintos orígenes y naturaleza, como, por ejemplo, asociar la localización de un objeto con las características físicas de este (Kesner et al., 2012). Además, junto con CA1, también se encuentra implicado en el aprendizaje de secuencias espaciales, siendo clave, por ejemplo, en la exploración de los brazos de un laberinto radial en un orden específico (Rolls y Kesner, 2006; Kesner y Rolls, 2015) y en la rápida codificación de la información, aprendiendo asociaciones tras un único intento (Rolls y Kesner, 2006; Kesner y Rolls, 2015). Por último, CA1 muestra un papel esencial en la capacidad para recuperar información tras una demora de varios minutos, la consolidación de nueva información y la facilitación de la recuperación de información, enviando proyecciones

al neocórtex (Rolls y Kesner, 2006; Kesner et al., 2012; Kesner y Rolls, 2015). Por todo lo descrito anteriormente, queda evidenciada la importancia de un trabajo conjunto del hipocampo y, en concreto, de CA1, CA3 y DG, para procesar la información espacial y temporal (Kesner y Rolls, 2015; Salz et al., 2016).

En relación con la funcionalidad de estas regiones en la EHNA, hay indicios que apuntan a que esta enfermedad no afecta a todas las regiones hipocampales por igual, sino que puede dañar zonas específicas como CA1 (Higarza et al., 2019). Además, es importante tener en cuenta que, puesto que CA1, CA3 y DG poseen subcapas (Paxinos y Watson, 2005), estas también podrían llegar a mostrar una actividad diferencial en respuesta a la EHNA. Así, sabemos que CA1 se encuentra dividido en las capas *Oriens*, *piramidal*, *Radiatum* y *Lacunosum-molecular*; CA3 en las capas *Oriens*, *piramidal*, *Radiatum*, *Lucidum* y *Lacunosum-molecular* y DG en las capas *molecular*, *granular* y *polimórfica* (Paxinos y Watson, 2005). Es de destacar que no tenemos constancia de otros artículos que estudien las alteraciones que puede producir el EHNA en estas capas, solamente en las regiones que las engloban, como es CA1, CA3 y DG, por lo que es interesante profundizar en este aspecto, siendo este uno de los objetivos del presente trabajo.

Una buena manera de abordar el estudio de la actividad encefálica es mediante la técnica histoquímica de la citocromo c oxidasa (CCO) (Gonzalez-Lima y Cada, 1994). La CCO es una enzima mitocondrial, localizada en el complejo IV de la cadena respiratoria, que se encuentra involucrada en el proceso de fosforilación oxidativa para generar energía en forma de ATP (Gonzalez-Lima y Cada, 1994). La técnica histoquímica de la CCO, a través del estudio de la densidad óptica del tejido encefálico, ofrece valores acerca de la actividad metabólica sostenida (Gonzalez-Pardo, Novelli, Menéndez-Patterson, y Arias, 1996). En consecuencia, nos permite comparar cuantitativamente las diferencias en la actividad metabólica de distintas estructuras encefálicas, ofreciéndonos un reflejo de la demanda energética de distintas regiones, llegando a ser útil asimismo para discernir posibles variaciones en diferentes subdivisiones de una estructura, como podrían ser las distintas capas que conforman las subdivisiones del hipocampo (Arias, Morán, Conejo y Arias, 2013). Además, la técnica de la CCO ha sido ampliamente utilizada en estudios de aprendizaje y memoria (Banqueri, Méndez y Arias, 2018; González-Pardo, Arias, Vallejo y Conejo, 2019;

Gutiérrez-Menéndez, Banqueri, Méndez y Arias, 2019), así como específicamente en tareas de memoria de trabajo espacial (Méndez-Couz, Conejo, González-Pardo y Arias, 2015; Zorzo, Méndez-López, Méndez y Arias, 2019).

Con todo ello, en el presente trabajo nos planteamos ahondar en las consecuencias, tanto a nivel conductual como a nivel encefálico, de la EHNA, por medio de la inducción de la mencionada patología, a través de una dieta alta en grasa y colesterol en ratas *Sprague-Dawley* macho. Específicamente, nuestro objetivo fue evaluar la ejecución en una tarea de memoria de trabajo espacial realizada en el RAWM, y determinar, a través de la histoquímica de la CCO, la actividad metabólica hipocampal subyacente, focalizándonos asimismo en las diferentes capas que conforman las distintas subregiones hipocampales.

2. Materiales y método

2.1. Sujetos

Para la realización de este experimento se han empleado un total de catorce ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa *Sprague-Dawley*, cuyos pesos promedio, al comienzo del experimento, eran de 220 gramos. Los animales fueron estabulados en grupos de cuatro miembros, en jaulas de plástico (*Tecniplast-Letica, Madrid*) cuyas dimensiones eran de 34x20x21 cm. Todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua, y se mantuvieron en una habitación con temperatura constante (22 ± 2 °C), con una humedad del $65 \pm 5\%$ y un ciclo artificial de luz-oscuridad de 12 h (08:00–20:00/20 00–08:00 h).

Para estudiar el efecto de la dieta alta en grasa y colesterol, las ratas fueron aleatoriamente divididas en dos grupos: grupo dieta control (DC) y grupo dieta alta en grasa y colesterol (DAGC), cada uno de ellos conformado por siete sujetos. El grupo DC recibió una dieta consistente en un 13% de las kcal provenientes de grasa y sin colesterol (*Envigo-2914*), mientras que al grupo DAGC se le administró una dieta con un 65% kcal provenientes de grasa, 2% de colesterol y 0,5% de ácido cólico (*Research Diets, D09052204*). Ambos grupos experimentales recibieron sus respectivas dietas durante catorce semanas.

Todos los procedimientos y manipulación de animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013 (BOE-A-2013-1337) del Gobierno de España y fueron aprobados por el Comité Veterinario del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron entre las 08.00 y las 13:00 h.

2.2. Procedimiento conductual

Con el objetivo de mantener un seguimiento de los efectos de la dieta, los animales fueron pesados semanalmente de manera sistemática. Una vez transcurridas las catorce semanas de dieta, los animales fueron sometidos a una tarea de memoria de trabajo. Sin embargo, previamente, se realizó un examen neurológico para descartar la existencia de anomalías que pudieran tener un impacto en dicha prueba conductual.

2.2.1. Examen neurológico. El examen neurológico se realizó de acuerdo con el procedimiento previamente descrito por Arias, Felipo y Arias (2014). Brevemente, consiste en evaluar nueve reflejos de manera individual: respuesta al tacto, abducción de las patas traseras, respuesta vestibular, reflejo de enderezamiento, reflejo de extensión y de flexión de las patas traseras, respuesta geotáctica negativa en rampa, capacidad de asimiento y sacudida de cabeza.

2.2.2. Tarea de memoria de trabajo espacial. Los animales de ambos grupos fueron sometidos a una tarea de memoria de trabajo en el RAWM. El laberinto consta de cuatro brazos negros de fibra de vidrio (80 x 12 cm cada brazo) dispuestos en forma de cruz, localizados en el interior de una piscina llena de agua hasta una altura de 30 cm (Figura 1). La temperatura del agua fue de 22 ± 2 °C. Para la realización de la tarea, los animales debían encontrar una plataforma sumergida por debajo del nivel del agua, de modo que se encontraba invisible, pero disponible. Específicamente, se trataba de una plataforma cilíndrica de 10 cm de diámetro y 28 cm de altura, 2 cm por debajo de la superficie del agua. La piscina se encontraba en el centro de una habitación de 16m², con un nivel de iluminación de 50 lux en el centro del laberinto. Alrededor de los cuatro cuadrantes del laberinto, se encontraban paneles con distintas pistas visuales, de diferentes formas y colores

Un día antes del comienzo de la tarea de memoria de trabajo espacial, todos los animales recibieron una sesión de habituación con el fin de familiarizarse con las contingencias de la tarea. Para ello, los animales fueron sometidos a tres ensayos con la plataforma disponible y visible, utilizando diferentes posiciones de partida en un tanque cuadrado de agua (47×75×38 cm). Al día siguiente, comenzó la tarea de memoria de trabajo espacial, teniendo lugar durante cinco días consecutivos. Cada uno de estos días constaba de dos ensayos, uno de muestra y uno de retención, en los que el animal debía encontrar la plataforma de escape, esta vez, invisible al situarse 2 cm por debajo del nivel del agua. En cada uno de los días, la plataforma permanecía fija en uno de los cuatro brazos del laberinto, siguiendo un orden pseudoaleatorio, y a cada rata se le permitía explorar el laberinto libremente, siendo liberada desde puntos distintos del laberinto, siempre dispuestos de manera pseudoaleatoria. En caso de que el sujeto no encontrara la plataforma de escape en 60 s, era guiada cuidadosamente por el experimentador hacia la misma, y colocada en la plataforma. La rata permanecía entonces en la plataforma de escape durante 15 s, tras lo cual, era colocada dentro de un cubo negro durante 5 s (intervalo entre ensayos), en caso de que se encontrara en el ensayo de muestra, o era devuelta a su jaula hogar al finalizar los dos ensayos por día.

Las latencias en alcanzar la plataforma en cada ensayo fueron registradas, estableciéndose como criterio de aprendizaje que los animales emplearan un tiempo significativamente menor en encontrar la plataforma en el ensayo de retención respecto al ensayo de muestra (Méndez et al., 2008).

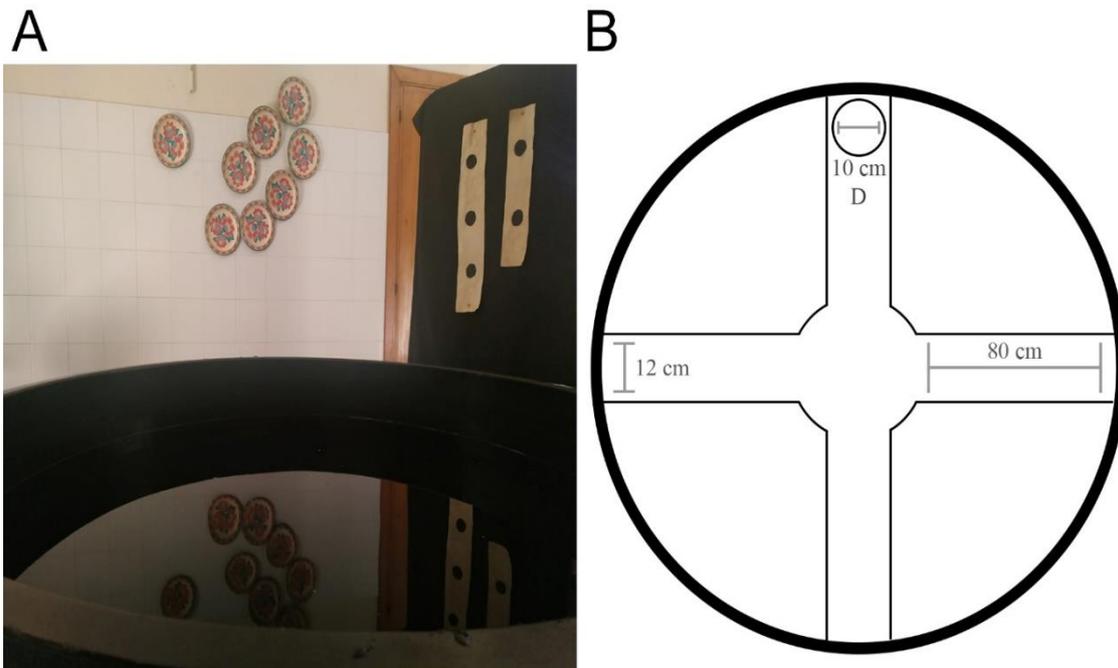


Figura 1. (A) Piscina de Morris utilizada en el experimento. (B) Esquema del laberinto radial que se coloca dentro de la piscina de Morris.

2.3. Obtención del tejido cerebral

Noventa minutos después de la última sesión de la tarea espacial de memoria de trabajo, los animales fueron sacrificados por medio de la decapitación. A continuación, los cerebros fueron rápidamente extraídos e inmediatamente congelados en N-metilbutano (*Sigma-Aldrich, España*) durante dos minutos y almacenados a -40°C para el estudio de la actividad metabólica de la citocromo c oxidasa. Seguidamente, los cerebros fueron seccionados mediante cortes coronales de $30\ \mu\text{m}$ de grosor a -20°C , utilizando un criostato (*Leica, CM1900, Alemania*) (Figura 2) y posteriormente montados en portaobjetos. La distancia respecto al Bregma, de acuerdo con el Atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2005), fue de $-3.00\ \text{mm}$ (Figura 3), con el objetivo de cuantificar el hipocampo dorsal. A esta distancia podemos observar y cuantificar correctamente las regiones de interés, la región CA1, la CA3 y el giro dentado (DG), así como sus respectivas capas, que son la capa *Oriens*, la capa *Radiatum* y la capa *Lacunosum-molecular* de CA1, las capa *Oriens*, *Lucidum* y *Radiatum* de CA3 y, dentro del DG, la *molecular*, *granular* y *polimórfica*.

A**B**

Figura 2. (A) Criostato utilizado para la obtención de las muestras (Leica, CM1900, Alemania). (B) Cerebro siendo seccionado en el criostato.

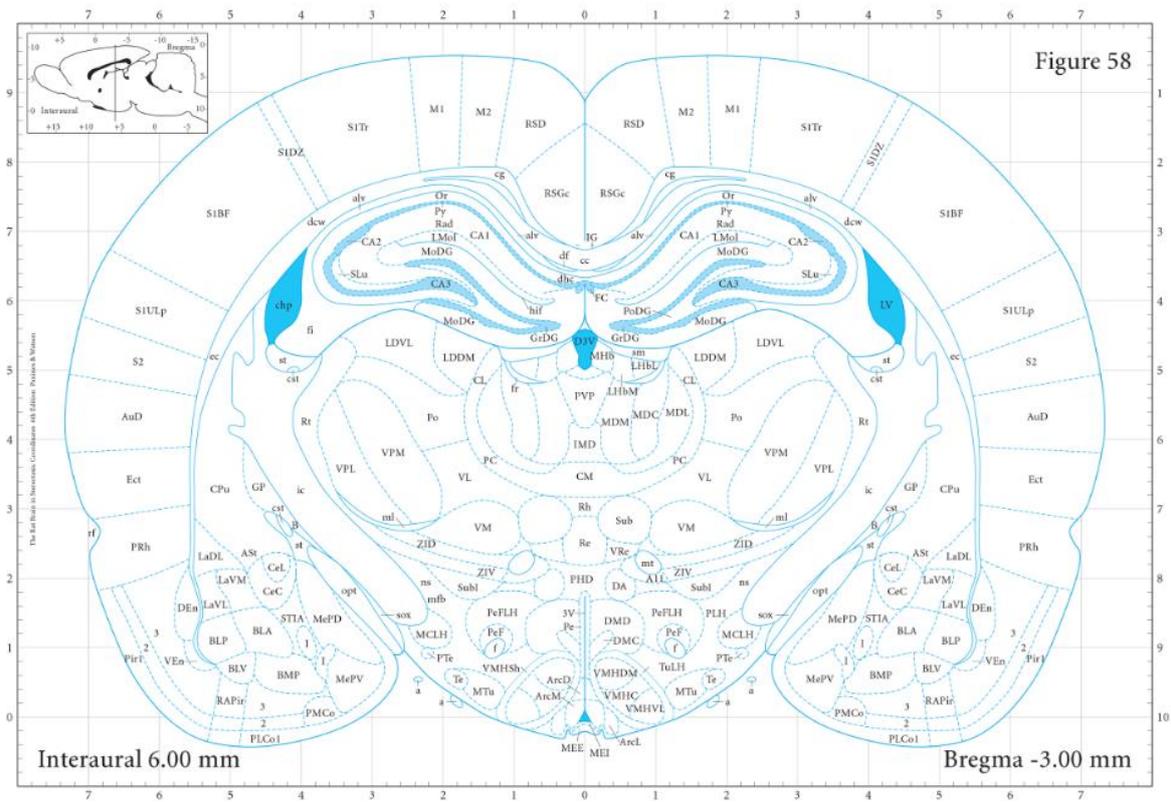


Figura 3. Bregma -3.00 mm del atlas de Paxinos y Watson (2005).

2.4. Técnica histoquímica de la citocromo c oxidasa

La técnica histoquímica de la COO proporciona una medida de la actividad metabólica cerebral basada en el método desarrollado por González-Lima y Cada (1994), que consiste en una versión modificada del protocolo descrito por Wong-Riley (1989).

Con el fin de controlar la variabilidad de tinción en los diferentes baños que tuvieron lugar, se cortaron con diferentes grosores (10, 30, 50 y 70 μm) conjuntos de estándares de homogeneización de tejido cerebral, cuya actividad CCO fue previamente determinada por espectrofotometría, y se incluyeron en cada lote de portaobjetos (González-Pardo et al., 1996).

Las secciones y los homogenizados estándar fueron tratados durante 5 min con un 0,5% (v/v) de glutaraldehído (*Merck, Alemania*), 10% (p/v) de sacarosa (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*) en una solución de tampón fosfato (0.1 M, pH 7.6). Posteriormente, las secciones se introdujeron tres veces, 5 min cada vez, en tampón fosfato (0.1 M, pH 7,6) con sacarosa al 10% (p/v) (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*), para a continuación ser sumergidas durante 10 min en una solución tampón Tris (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*) (0,05 M, pH 7,6) que contenía 0,5% (v/v) de dimetilsulfóxido (*Fisher Scientific, EE. UU.*), 10% (p/v) de sacarosa (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*) y 0.0275% (m/v) de cloruro de cobalto hexahidratado (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*). Una vez las secciones y estándares fueron enjuagadas en un tampón fosfato (0.1 M, pH 7.6), se incubaron en la oscuridad a 37 ° C en una solución PBS (0.1 M, pH 7.6), que contenía 0,0075% (p/v) de citocromo c (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*), 0,002% (p/v) de catalasa (*Alfa Aesar, EE. UU.*), 5% (p/v) de sacarosa (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*), 0.25% (v/v) dimetilsulfóxido (*Fisher Scientific, EE. UU.*) y 0,05% (p/v) de tetrahidrocloreuro de diaminobencidina (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*) durante 1 h, en agitación lenta y continua. La reacción fue detenida fijando el tejido, durante 30 min, en una solución de formaldehído al 4% (v/v) (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*) con 10% (p/v) de sacarosa (*Sigma-Aldrich, EE. UU.*). Finalmente, las secciones y estándares fueron deshidratadas mediante alcoholes etílicos crecientes (*VWR, España*) (30°-100°, 5 min en cada uno), aclaradas con xileno (*J.T. Baker, EE. UU.*) durante 10 min y cubiertas con Entellan (*Merck, Alemania*).

2.4.1. Cuantificación densitométrica de la histoquímica de la citocromo c oxidasa. La intensidad de tinción histoquímica de CCO se cuantificó mediante análisis densitométrico, utilizando una estación de trabajo para análisis de imagen controlado por ordenador (*MCID, InterFocus Imaging Ltd., Linton, England*), compuesta por una cámara, un iluminador y el software especializado *MCID Core 7.0 (MCID, Interfocus Imaging Ltd., Linton, Inglaterra)*, tal y como describieron Gutiérrez-Menéndez et al. (2019).

La lámpara fue encendida 90 minutos antes de la cuantificación para asegurar la estabilidad de su intensidad durante el proceso de cuantificación. Se midió la densidad óptica media de cada una de las regiones y capas del hipocampo mencionadas en el apartado 2.3. Para ello, se comenzó realizando una medida de CA1, CA3 y DG, para a continuación proceder a la cuantificación por capas (Figura 4).

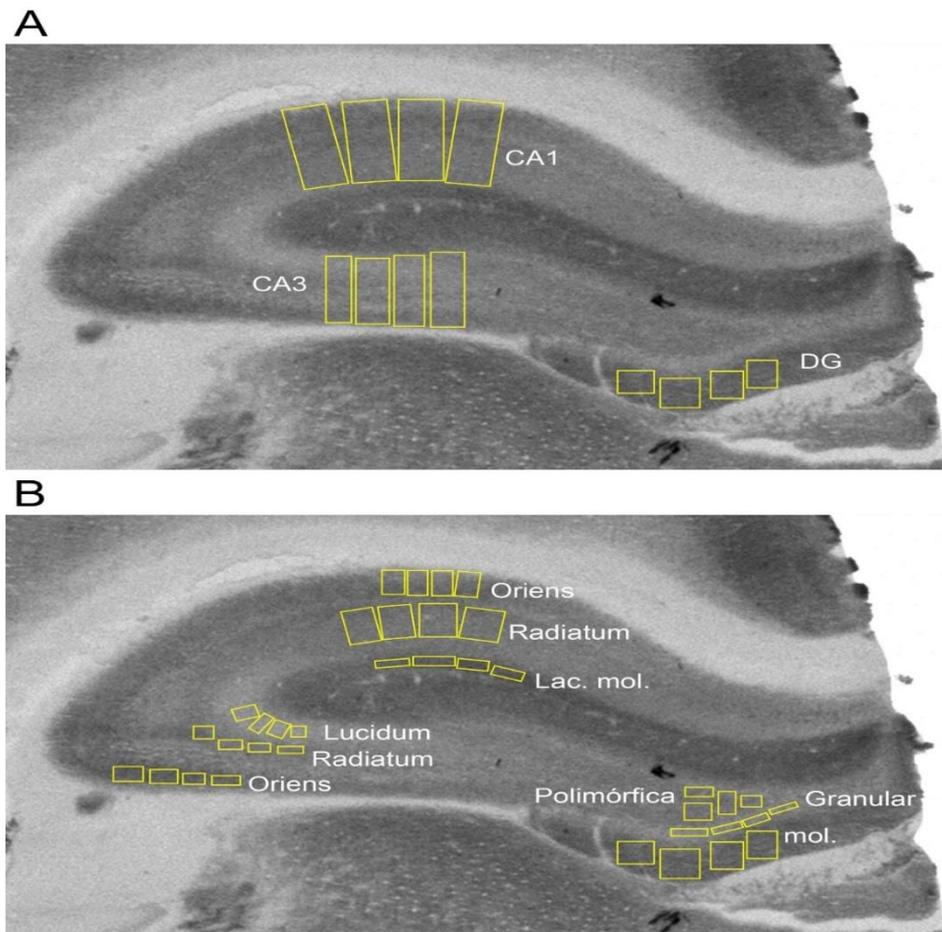


Figura 4. (A) Cuantificación de la actividad CCO en las regiones CA1, CA3 y DG. (B) Cuantificación de la actividad CCO en las capas *Oriens*, *Radiatum* y *Lacunosum-molecular* (Lac. mol) en CA1, *Oriens*, *Radiatum* y *Lucidum* en CA3 y *molecular* (mol), *granular* y *polimórfica*, en el DG.

Previamente a la cuantificación, se debía realizar la calibración con el homogenado correspondiente a cada sección de tejido, es decir, los que hubiesen sido tratados en cada uno de los baños que tuvieron lugar, para poder controlar las posibles variaciones de la tinción. Se tomaban 10 muestras de densidad de cada uno de los grosores del estándar (10, 30, 50 y 70 μm) y con ello el programa MCID Core 7.0 realizaba una curva de regresión, que relacionaba el parámetro de densidad óptica con los niveles enzimáticos de CCO. Empleando dicha curva de regresión calculada, los valores de densidad óptica obtenidos en cada región fueron convertidos en unidades de actividad CCO (μmol de citocromo c oxidado/min/g tejido a 23°C).

Posteriormente, se tomaron doce medidas no superpuestas en cada una de las regiones y capas, realizándose cuatro medidas por sección en tres secciones consecutivas, por área de interés y sujeto. Para ello, se ajustó la forma y el tamaño de los disectores al área de la región, manteniendo un criterio uniforme en la selección de las secciones, para asegurarnos que las medidas se realizaban a la misma distancia de Bregma en todos los sujetos. Por último, se estableció un promedio de las 12 lecturas, por área de interés y sujeto, para a continuación, extraer una media de actividad metabólica grupal en cada una de las regiones cuantificadas.

2.5. Análisis estadísticos

Los datos enzimáticos y conductuales han sido analizados utilizando el SPSS 22 (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) para las pruebas estadísticas y el Excel Office 2016 para realizar los gráficos.

Para los datos de actividad enzimática se obtuvo el promedio, desviación típica y error estándar de cada región por grupo. Para cada grupo se probó el supuesto de normalidad, usando Shapiro-Wilk, y el de homocedasticidad de varianzas, empleando la prueba de Levene. A continuación, se realizaron las comparaciones por región entre el grupo control y el grupo experimental, usando una prueba *t* de Student para muestras independientes. En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad o el de homocedasticidad, se utilizó su prueba equivalente no paramétrica, la U de Mann-Whitney.

Para los datos de la tarea de memoria de trabajo se obtuvo el promedio, desviación típica y error estándar por ensayo (muestra y retención) y grupo (DC y DAGC) de las latencias en encontrar la plataforma de escape. Se probó el supuesto de normalidad para cada grupo y tipo de ensayo, usando Shapiro-Wilk, así como el de la homogeneidad de varianzas por medio de la Prueba de Levene. Posteriormente, se realizó una comparación por tipo de ensayo entre el grupo DC y el grupo DAGC, realizando una prueba *t* de Student para muestras independientes. En caso de no cumplirse alguno de los dos supuestos, se utilizó su equivalente no paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney. Además, se ha realizado un análisis intragrupo con el objetivo de estudiar posibles diferencias entre los dos tipos de ensayo, para cada uno de los dos grupos, realizándose para ello una prueba *t* de Student para muestras relacionadas. En el caso de no cumplirse el supuesto de normalidad o el supuesto de homogeneidad de varianzas, se empleó su equivalente no paramétrico, la prueba de Wilcoxon. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Examen neurológico

Todos los sujetos, tanto los pertenecientes al grupo DC como al DAGC, superaron con éxito el examen neurológico realizado, lo que indica que no presentaban afección de los principales reflejos.

3.2. Tarea de memoria de trabajo espacial

Los análisis estadísticos intrasujeto han revelado que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la latencia de muestra y la latencia de retención en el grupo DC (Wilcoxon, $Z = -2,023$, $n_1=5$, $n_2=5$, $P = 0,043$), indicando esto que los animales eran capaces de recordar la plataforma. Sin embargo, el grupo DAGC no muestra una diferencia estadísticamente significativa entre ambos ensayos ($Z = -1,483$, $n_1=5$, $n_2=5$, $P = 0,138$) (Figura 5). Esto indica que las ratas de este grupo no realizaron correctamente el aprendizaje.

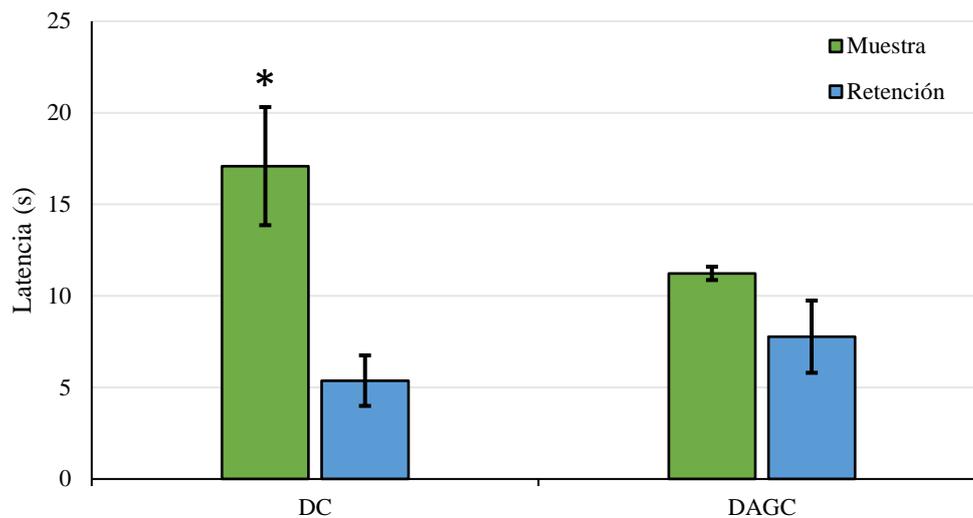


Figura 5. Memoria de trabajo espacial evaluada en el RAWM. El grupo DC muestra una diferencia estadísticamente significativa entre el ensayo de muestra y retención (* $p < 0,05$), mientras que el grupo DAGC no ($p > 0,05$). Los valores están expresados como media \pm error estándar.

Sin embargo, respecto al ensayo de muestra, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo DC y el grupo DAGC ($t_{(8)} = 1,804$, $P = 0,109$). En cuanto al ensayo de retención, nuestros resultados tampoco muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($U = 5,000$, $n_1 = 5$, $n_2 = 5$, $P = 0,116$) (Figura 6).

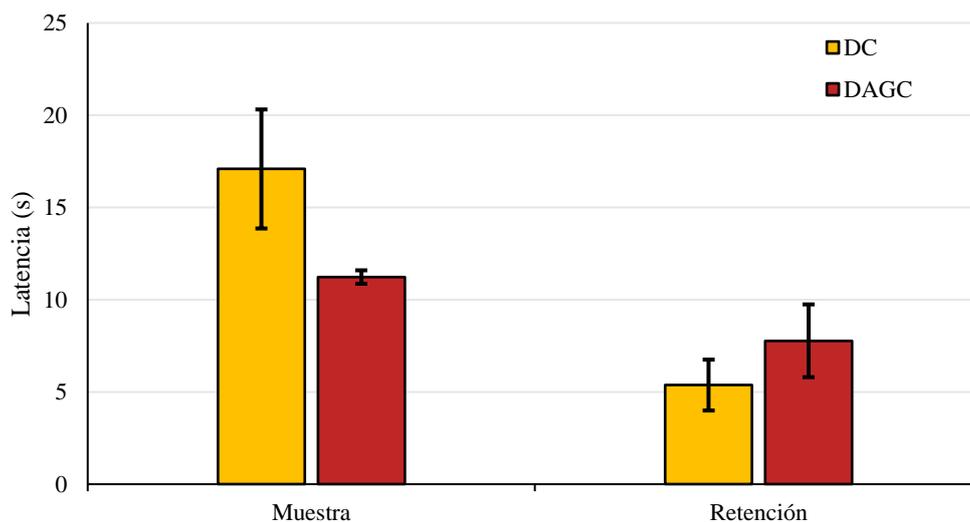


Figura 6. Memoria de trabajo espacial evaluada en el RAWM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo DC y el grupo DAGC en las latencias de los ensayos de muestra y retención, respectivamente ($p > 0,05$). Los valores están expresados como media \pm error estándar.

3.3. Actividad metabólica cerebral

No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de CCO de ambos grupos en ninguna de las regiones hipocampales analizadas, ni en sus respectivas capas (Figura 7): CA1: $t_{(12)} = -1,225$, $P = 0,224$; CA3: $t_{(12)} = -1,797$, $P = 0,098$; DG: $U = 12,000$, $n_1 = 7$, $n_2 = 7$, $P = 0,110$; CA1 *Oriens*: $t_{(12)} = -1,373$, $P = 0,195$; CA1 *Radiatum*: $t_{(12)} = -1,618$, $P = 0,132$; CA1 *Lacunosum-molecular*: $t_{(12)} = -1,427$, $P = 0,179$; CA3 *Oriens*: $t_{(12)} = -1,430$, $P = 0,178$; CA3 *Radiatum*: $t_{(12)} = -0,960$, $P = 0,356$; CA3 *Lucidum*: $t_{(12)} = -2,116$, $P = 0,056$; DG *molecular*: $t_{(12)} = -2,015$, $P = 0,067$; DG *granular*: $U = 22,000$, $n_1 = 7$, $n_2 = 7$, $P = 0,749$; DG *polimórfica*: $t_{(12)} = -1,807$, $P = 0,096$.

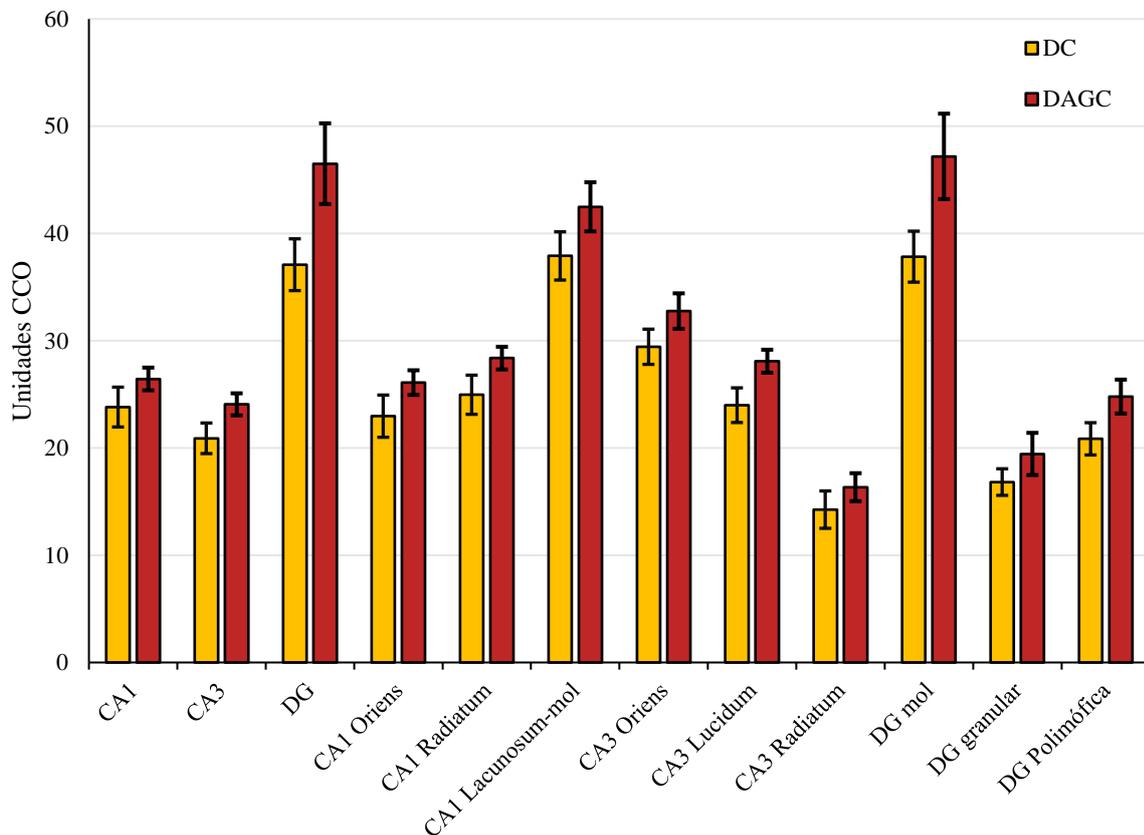


Figura 7: Actividad de la CCO en el grupo DC y el grupo DAGC. Los valores están expresados como media \pm error estándar. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones cuantificadas ($p > 0,05$).

4. Discusión

El objetivo de este trabajo era el de ampliar el conocimiento sobre los efectos cognitivos y las alteraciones encefálicas que puede provocar la EHNA. Sabemos que el HGNA y su estadio más avanzado, la EHNA, es una enfermedad que afecta a una gran parte de la población mundial (Younossi et al., 2016). Además, tiene serias implicaciones para la vida de las personas que las padecen, como el daño hepático, que puede derivar en otras enfermedades más graves y de elevada mortalidad, la cirrosis y el carcinoma celular (Vernon et al., 2011), así como un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (EASL y EASD, 2016). Esto último se puede explicar porque el HGNA se encuentra asociado a enfermedades como la obesidad (EASL y EASD, 2016), la cual es un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (Grundy et al., 2005) y la diabetes tipo 2 (EASL y EASD, 2016).

En los últimos años, algunos artículos han señalado las posibles relaciones entre el HGNA y problemas como la depresión y la ansiedad (Weinstein et al., 2011; Lee et al., 2013; Moretti et al., 2019). Sin embargo, tal y como se refleja en la introducción del presente trabajo, estos resultados parecen no ser consistentes y requieren de más investigación (Macavei et al., 2015). En cuanto a aspectos cognitivos, se ha mostrado que estas enfermedades pueden producir disfunciones leves de la función ejecutiva y visoespacial (Celikbilek et al., 2018; Moretti et al., 2019). Asimismo, en experimentación animal, se han hallado déficits en tareas de memoria espacial, en ratas con HGNA y EHNA inducido por la dieta (Chen et al., 2019; Higarza et al., 2019). En pruebas en el laberinto acuático de Morris, estos animales presentan un peor aprendizaje espacial, teniendo más dificultades para recordar la posición de la plataforma de escape y pasando menos tiempo en el cuadrante que la contenía (Chen et al., 2019), mientras que en pruebas en el RAWM, idénticas a las realizadas en este trabajo, se observa un déficit de memoria de trabajo, ya que los animales con EHNA inducido no tardan un tiempo significativamente menor en llegar a la plataforma en el ensayo de retención, en referencia al de muestra (Higarza et al., 2019). Este déficit en la memoria de trabajo también se encuentra en pruebas en el laberinto en forma de Y, al comparar la capacidad de los animales para recordar que brazo habían visitado más recientemente (Kraeuter,

Guest y Sarnyai, 2019), siendo más probable que las ratas con HGNA re-exploren el brazo en el que estuvieron anteriormente, en vez del novedoso (Pinçon et al., 2019).

Dichas alteraciones emocionales, cognitivas y/o conductuales que se han observado en el HGNA o la ENHA, pueden venir acompañadas de disfunciones a nivel encefálico. De ese modo, se han observado alteraciones en la actividad metabólica del hipocampo (Higarza et al., 2019), además de alteraciones metabólicas en otras áreas del encéfalo (Higarza et al., 2019). También se ha encontrado un desbalance de proteínas importantes para la memoria, el aprendizaje y el estado de ánimo, como la copina 6, en el hipocampo y la corteza prefrontal (Chen et al., 2019). Además, algunos artículos muestran como dietas altas en grasas producen alteraciones en el hipocampo, en concreto, una disminución de la potenciación a largo plazo, consistente en el fortalecimiento persistente de la sinapsis entre CA1 y CA3, correlacionando negativamente con el peso del hígado (Gasparova et al., 2018). Esta potenciación a largo plazo es un fenómeno en estrecha relación con la memoria, cumpliendo un rol muy importante en el aprendizaje y memoria (Nicoll, 2017). También se ha observado un estrechamiento de la capa piramidal de CA1 (Gasparova et al., 2018), pudiendo esto suponer una pérdida de neuronas, ya que en la capa piramidal del CA1 es donde se concentran los cuerpos de las neuronas piramidales (Fröhlich, 2016). Incluso, algunos artículos muestran como la ENHA produce cambios histológicos en el cerebelo, con daño vascular, disminución de células de Purkinje, y activación de la microglía y astrocitos, aunque en menor medida que en pacientes con cirrosis o hígado graso alcohólico (Balzano et al., 2018). Por último, es relevante destacar que existen artículos que apuntan a una posible reducción del volumen cerebral en pacientes con HGNA (Filipović et al., 2018; Weinstein et al., 2018b)

En el presente estudio, los resultados en la prueba de memoria de trabajo espacial, realizada en el RAWM, han mostrado un déficit en este tipo de memoria en los animales del grupo DAGC, los cuales han desarrollado EHNA debido a que fueron alimentados durante catorce semanas con una dieta alta en grasas y colesterol (Thomsen et al., 2014). Estos animales completaron con éxito el examen neurológico, por lo que los

déficits conductuales observados no se debían a una alteración previa neurológica, sino al efecto de la dieta. Al comparar las latencias de escape entre cada ensayo dentro de un mismo grupo, observamos que el grupo DC ha experimentado un correcto aprendizaje de la tarea, pues las latencias del ensayo de retención fueron significativamente menores que las del ensayo de muestra, considerándose esto un criterio de aprendizaje (Méndez et al., 2008). Si bien no se han encontrado diferencias significativas entre las latencias de escape entre el grupo DC y DAGC dentro de un mismo ensayo, se ha observado que en las ratas del grupo DAGC no ha existido un aprendizaje espacial significativo, ya que el tiempo para alcanzar la plataforma no se redujo de manera significativa entre los ensayos de muestra y retención (Méndez et al., 2008). Para la correcta realización de la tarea, los animales han tenido que emplear la memoria de trabajo espacial para recordar en qué posición se encontraba la plataforma, según el día del test, y así poder evitar con mayor rapidez el estímulo aversivo que les supone el agua (Alamed et al., 2006). Nuestros resultados en esta prueba demuestran que el EHNA provoca una disfunción en la memoria de trabajo y son consistentes con diversos artículos que obtienen las mismas conclusiones, realizados tanto en el RAWM como en el laberinto en forma de Y (Weinstein et al., 2018a; Higarza et al., 2019; Pinçon et al., 2019). En humanos, al comparar sujetos con diabetes tipo 2, con y sin HGNA, los que presentaban además esta patología del hígado, han obtenido peores resultados en tareas que requieren memoria de trabajo, así como en tareas que exigen velocidad de procesamiento y atención sostenida (Weinstein et al., 2018a). Además, existen más estudios que vinculan déficits de memoria de trabajo con patologías del hígado, como la cirrosis –que, además, puede ser una derivación de la EHNA–, que daña de manera más severa este tipo de memoria, siendo los sujetos con cirrosis incapaces de recordar la posición de la plataforma de escape en una prueba en el laberinto acuático de Morris (Méndez et al., 2008).

Aunque una de las principales áreas que modula la memoria de trabajo es la corteza prefrontal (Funahashi y Kubota, 1994), sabemos que el hipocampo también constituye un papel muy importante en la memoria de trabajo (Bear et al., 2020). Daños en el hipocampo han demostrado, a través de diversos estudios, déficits en la memoria de trabajo visoespacial en pacientes que carecían de él, en pacientes con daño unilateral en el lóbulo temporal (Owen, Morris, Sahakian, Polkey y Robbins, 1996), así como en

personas que han sufrido lobotomías del lóbulo temporal derecho (Feigenbaum, Polkey y Morris, 1996). De manera similar, estudios en roedores ha mostrado déficits en la realización de tareas de memoria de trabajo espacial tras lesiones hipocampales (Morris et al., 1986). Por lo tanto, ello parece sugerir que una afectación de la memoria de trabajo espacial puede estar causada por una alteración en algunas de las áreas encefálicas involucradas, como el hipocampo (Bear et al., 2020). Sabemos que CA1 es especialmente importante para la recuperación y consolidación de la información espacial (Rolls y Kesner, 2006; Kesner, Morris y Weeden, 2012; Kesner y Rolls, 2015), y de encontrarse alterado, podría explicar el aprendizaje deficiente de las ratas con EHNA en la tarea de memoria de trabajo espacial, algo que es consistente con los resultados obtenidos por Higarza et al. (2019), que presenta evidencias de alteraciones en CA1 en ratas con EHNA. En cambio, en el presente estudio no se encuentran diferencias significativas en la actividad metabólica en ninguna de las regiones del hipocampo, ni en ninguna de sus respectivas capas. Esto puede indicar que los déficits hallados en la memoria de trabajo no se deban a una alteración del hipocampo, sino a la alteración de otras áreas involucradas en este tipo de memoria, como la corteza prefrontal (Funahashi y Kubota, 1994; Bear et al., 2020), la cual también se encuentra alterada en anteriores estudios (Higarza et al., 2019), y tampoco podemos olvidar que la técnica de la CCO se ha realizado pasados 90 minutos desde la prueba de memoria de trabajo, existiendo una disminución de la actividad metabólica con el paso del tiempo (Méndez-López, Méndez, López, Cimadevilla y Arias, 2009). Sin embargo, este es el primer estudio cuyo objetivo es analizar estas alteraciones de manera más profunda, capa por capa, estudiando la actividad metabólica de las capas *Oriens*, *Radiatum* y *Lac. mol.* en CA1, *Oriens*, *Radiatum* y *Lucidum* en CA3; y *molecular*, *granular* y *polimórfica* en el DG. Si bien es cierto que en el presente trabajo no se han encontrado alteraciones a nivel del metabolismo neuronal en las distintas regiones del hipocampo y sus capas, no podemos descartar que pueden existir alteraciones de distinto tipo, como las encontradas en expresión de proteínas, modificación del volumen o grosor de tejidos y alteración de las sinapsis, que muestran otros autores (Gasparova et al., 2018; Chen et al., 2019).

Es importante mencionar también los nuevos avances tanto psicológicos como farmacológicos para el tratamiento de estas patologías. Hay abundante evidencia de que los cambios en los hábitos de salud, tales como modificación de la dieta, ejercicio y pérdida de peso, son muy importantes para tratar y prevenir el HGNA (Mavrogiannaki y Migdalis, 2013; Marchesini et al., 2016), aunque no son medidas suficientes para los estadios más avanzados (Marchesini et al., 2016). Para ello se requieren de otras medidas, como el tratamiento farmacológico, el cual se está investigando muy activamente, aunque no existe aún un medicamento específico que haya concluido exitosamente todas las fases de los ensayos clínicos (Marchesini et al., 2016; Francque y Vonghia, 2019). También existen evidencias de que los probióticos tienen efectos positivos (Sáez-Lara, Robles-Sanchez, Ruiz-Ojeda, Plaza-Diaz y Gil, 2016), ya que tratan la disbiosis intestinal que lleva a la enfermedad (Gómez-Cortés et al., 2015). Por último, en casos graves se requieren medidas quirúrgicas, como cirugía bariátrica (Marchesini et al., 2016) y trasplante de hígado para los casos graves con fallo hepático o cirrosis (Marchesini et al., 2016).

Finalmente, hay que tener en cuenta que este estudio presenta como limitación que la muestra era pequeña y mostraba una alta variabilidad en las pruebas de memoria de trabajo, lo que pudo reducir la potencia de las pruebas estadísticas.

5. Conclusión

La esteatohepatitis no alcohólica, el estadio avanzado de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, es una enfermedad que provoca serias implicaciones para la salud de los afectados, cuya prevalencia ha aumentado drásticamente en los últimos años. Este trabajo aporta más información sobre sus efectos deletéreos en la memoria, especialmente en la memoria de trabajo espacial. Además, observamos que este déficit de memoria no se traduce en una alteración del hipocampo, ya que nuestros sujetos experimentales no presentaban diferencias significativas en la actividad metabólica hipocampal, ni en sus principales regiones, ni en las distintas capas que lo conforman. Se requiere más investigación para comprender los efectos que estas patologías del hígado producen tanto a nivel cognitivo como encefálico.

6. Referencias

- Alamed, J., Wilcock, D. M., Diamond, D. M., Gordon, M. N., y Morgan, D. (2006). Two-day radial-arm water maze learning and memory task; robust resolution of amyloid-related memory deficits in transgenic mice. *Nature Protocols*, 1(4), 1671-1679. doi:10.1038/nprot.2006.275
- Anstee, Q. M., Targher, G., y Day, C. P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(6), 330-344. doi:10.1038/nrgastro.2013.41
- Arias, N., Morán, J., Conejo, N. M., y Arias, J. L. (2013). Sexual metabolic differences in the rat limbic brain. *Psicothema*, 25(4), 461-467. doi:10.7334/psicothema2013.100
- Arias, N., Fidalgo, C., Felipo, V., y Arias, J. L. (2014). The effects of hyperammonemia in learning and brain metabolic activity. *Metabolic brain disease*, 29(1), 113-120. doi:10.1007/s11011-013-9477-0
- Armesto, R. A., Díaz, J. L. D., Peromingo, J. D., González, A. R., Mao, M. C., y Martínez, F. D. L. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia Clínica*, 72(1), 7-17.
- Baddeley, A. D., y Hitch, G. (1974) Working memory. En: *Vol. 8. Psychology of Learning and Motivation - Advances in Research and Theory* (pp. 47-89).
- Baddeley, A. (1992). Working memory. *Science*, 255(5044), 556-559. doi:10.1126/science.1736359
- Balzano, T., Forteza, J., Borreda, I., Molina, P., Giner, J., Leone, P., ... Felipo, V. (2018). Histological features of cerebellar neuropathology in patients with alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 77(9), 837-845. doi:10.1093/jnen/nly061
- Banqueri, M., Méndez, M., y Arias, J. L. (2018). Why are maternally separated females inflexible? Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Neurobiology of learning and memory*, 155, 30-41. doi:10.1016/j.nlm.2018.06.007

- Bear, M., Connors, B., y Paradiso, M. A. (2020). *Neuroscience: Exploring the brain*. Jones y Bartlett Learning, LLC.
- Celikbilek, A., Celikbilek, M., y Bozkurt, G. (2018). Cognitive assessment of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 30(8), 944-950. doi:10.1097/MEG.0000000000001131
- Chen, X., Yun, X. Y., Wu, R., Chen, Z., Fang, K., Han, Y., ... Ge, J. (2019). Resveratrol reduces glucolipid metabolic dysfunction and learning and memory impairment in a NAFLD rat model: involvement in regulating the imbalance of nesfatin-1 abundance and copine 6 expression. *Frontiers in endocrinology*, 10, 434. doi:10.3389/fendo.2019.00434
- Dinan, T. G., y Cryan, J. F. (2017). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 77–89. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.007
- Eslam, M., Valenti, L., y Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: clinical impact. *Journal of hepatology*, 68(2), 268-279. doi:10.1016/j.jhep.2017.09.003
- European Association for the Study of The Liver, y European Association for the Study of Diabetes (EASD). (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obesity facts*, 9(2), 65-90. doi:10.1159/000443344
- Farrell, G. C., y Larter, C. Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 43(2 SUPPL. 1), 99-112. doi:10.1002/hep.20973
- Feigenbaum, J. D., Polkey, C. E., y Morris, R. G. (1996). Deficits in spatial working memory after unilateral temporal lobectomy in man. *Neuropsychologia*, 34(3), 163-176. doi:10.1016/0028-3932(95)00107-7
- Filipović, B., Marković, O., Đurić, V., y Filipović, B. (2018). Cognitive changes and brain volume reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018. doi:10.1155/2018/9638797

- Francque, S., y Vonghia, L. (2019). Pharmacological treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Advances in therapy*, 36(5), 1052-1074. doi:10.1007/s12325-019-00898-6
- Fröhlich, F. (2016). Capítulo 8 - Microcircuits of the Hippocampus. En F. Fröhlich (Ed.), *Network Neuroscience* (pp. 97-109). San Diego: Academic Press. doi: 10.1007/s11064-018-2583-y
- Funahashi, S., y Kubota, K. (1994). Working memory and prefrontal cortex. *Neuroscience research*, 21(1), 1-11. doi:10.1016/0168-0102(94)90063-9
- Gasparova, Z., Janega, P., Weismann, P., El Falougy, H., Kaprinay, B. T., Liptak, B., ... Sotnikova, R. (2018). Effect of metabolic syndrome on neural plasticity and morphology of the hippocampus: Correlations of neurological deficits with physiological status of the rat. *General Physiology and Biophysics*, 37(6), 619-632. doi:10.4149/gpb_2018016
- Golabi, P., Otgonsuren, M., Cable, R., Felix, S., Koenig, A., Sayiner, M., y Younossi, Z. M. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with impairment of health related quality of life (HRQOL). *Health and quality of life outcomes*, 14(1), 18. doi:10.1186/s12955-016-0420-z
- Gómez-Cortés, E., Pérez-Cabeza de Vaca, R., Martínez-Hernández, J. E., Guerrero-Celis, N., Mondragón-Terán, P., Alcaráz-Estrada, S. L., ... Suárez-Cuenca, J. A. (2015). Permeabilidad intestinal y eje intestino-hígado. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 20(1), 83-89.
- Gonzalez-Lima F, Cada A. (1994). Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: a qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience*, 63(2), 559-78. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90550-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90550-9) PMID: 7891865
- Gonzalez-Pardo, H., Novelli, A., Menéndez-Patterson, A. y Arias, J. L. (1996). The developmental of oxidative metabolism in diencephalic structures of the rat: a quantitative study. *Brain Res Bull*, 41(1), 31-38. Doi:10.1016/0361-9230(96)00007-x

- González-Pardo, H., Arias, J. L., Vallejo, G., y Conejo, N. M. (2019). Environmental enrichment effects after early stress on behavior and functional brain networks in adult rats. *PLoS ONE*, *14*(12). doi:10.1371/journal.pone.0226377
- Goodrich-Hunsaker, N. J., Hunsaker, M. R., y Kesner, R. P. (2008). The Interactions and Dissociations of the Dorsal Hippocampus Subregions: How the Dentate Gyrus, CA3, and CA1 Process Spatial Information. *Behavioral Neuroscience*, *122*(1), 16-26. doi:10.1037/0735-7044.122.1.16
- Granholm, A. C., Bimonte-Nelson, H. A., Moore, A. B., Nelson, M. E., Freeman, L. R., y Sambamurti, K. (2008). Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *Journal of Alzheimer's Disease*, *14*(2), 133-145. doi:10.3233/JAD-2008-14202
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., ... Spertus, J. A. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, *112*(17), 2735-2752. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404
- Gutiérrez-Menéndez, A., Banqueri, M., Méndez, M., y Arias, J. L. (2019). How Does Maternal Separation Affect the Cerebellum? Assessment of the Oxidative Metabolic Activity and Expression of the c-Fos Protein in Male and Female Rats. *The Cerebellum*, *19*(1), 68-77. doi:10.1007/s12311-019-01087-5
- Higarza, S. G., Arboleya, S., Gueimonde, M., Gómez-Lázaro, E., Arias, J. L., y Arias, N. (2019). Neurobehavioral dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis is associated with hyperammonemia, gut dysbiosis, and metabolic and functional brain regional deficits. *PloS one*, *14*(9). doi:10.1371/journal.pone.0223019
- Hunsaker, M. R., y Kesner, R. P. (2008). Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3, and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task. *Hippocampus*, *18*(9), 955-964. doi:10.1002/hipo.20455
- Jiang, M., Wu, N., Chen, X., Wang, W., Chu, Y., Liu, H., ... Xu, B. (2019). Pathogenesis of and major animal models used for nonalcoholic fatty liver disease.

- Journal of International Medical Research*, 47(4), 1453-1466.
doi:10.1177/0300060519833527
- Kesner, R. P., Lee, I., y Gilbert, P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Reviews in the Neurosciences*, 15(5), 333-351. doi:10.1515/REVNEURO.2004.15.5.333
- Kesner, R. P., Morris, A. M., y Weeden, C. S. S. (2012). Spatial, Temporal, and Associative Behavioral Functions Associated with Different Subregions of the Hippocampus. En *The Oxford Handbook of Comparative Cognition*.
doi:10.1093/oxfordhb/9780195392661.013.0018
- Kesner, R. P., y Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 92-147. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.11.009
- Kim, D. G., Krenz, A., Toussaint, L. E., Maurer, K. J., Robinson, S. A., Yan, A., ... Bynoe, M. S. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer's disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 1. doi:10.1186/s12974-015-0467-5
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C. y Sarnyai, Z. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. En *Pre-Clinical Models* (pp. 105-111). Humana Press, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_10
- Lee, I., Hunsaker, M. R., y Kesner, R. P. (2005). The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. *Behavioral Neuroscience*, 119(1), 145-153.
doi:10.1037/0735-7044.119.1.145
- Lee, K., Otgonsuren, M., Younoszai, Z., Mir, H. M., y Younossi, Z. M. (2013). Association of Chronic Liver Disease with Depression: A Population-Based Study. *Psychosomatics*, 54(1), 52-59. doi:10.1016/j.psych.2012.09.005
- Li, J., Zou, B., Yeo, Y. H., Feng, Y., Xie, X., Lee, D. H., ... Nguyen, M. H. (2019). Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, 1999–2019: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology y Hepatology*, 4(5), 389-398. doi:https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30039-1

- Liu, W., Baker, R. D., Bhatia, T., Zhu, L., y Baker, S. S. (2016). Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(10), 1969-1987. doi:10.1007/s00018-016-2161-x
- Macavei, B., Baban, A., y Dumitrascu, D. L. (2016). Psychological factors associated with NAFLD/NASH: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(24), 5081-97.
- Marchesini, G., Day, C. P., Dufour, J. F., Canbay, A., Nobili, V., Ratziu, V., ... Mathus-Vliegen, L. (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 64(6), 1388-1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004
- Mayer, E. A., Tillisch, K., y Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 926-938. doi:10.1172/JCI76304.
- Mavrogiannaki, A. N., y Migdalis, I. N. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: Newer data. *International Journal of Endocrinology*, 2013. doi:10.1155/2013/450639
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M. A., Arias, J., y Arias, J. L. (2008). Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis. *Physiology y behavior*, 95(3), 302-307. doi:10.1016/j.physbeh.2008.06.013
- Méndez-Couz, M., Conejo, N. M., González-Pardo, H., y Arias, J. L. (2015). Functional interactions between dentate gyrus, striatum and anterior thalamic nuclei on spatial memory retrieval. *Brain research*, 1605, 59-69. doi:10.1016/j.brainres.2015.02.005
- Méndez-López, M., Méndez, M., López, L., y Arias, J. L. (2009). Spatial working memory learning in young male and female rats: involvement of different limbic system regions revealed by cytochrome oxidase activity. *Neuroscience research*, 65(1), 28-34. doi:10.1016/j.neures.2009.05.001
- Méndez-López, M., Méndez, M., López, L., Cimadevilla, J. M. y Arias, J. L. (2009). Hippocampal heterogeneity in spatial memory revealed by cytochrome oxidase. *Neuroscience letters*, 452(2), 162-166. doi:10.1016/j.neulet.2009.01.056

- Moretti, R., Caruso, P., y Gazzin, S. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease and neurological defects. *Annals of hepatology*, 18(4), 563-570.
doi:10.1016/j.aohep.2019.04.007
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47-60.
doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Morris, A. M., Churchwell, J. C., Kesner, R. P., y Gilbert, P. E. (2012). Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(3), 326-331.
doi:10.1016/j.nlm.2012.02.005
- Nadel, L., y MacDonald, L. (1980). Hippocampus: cognitive map or working memory? *Behavioral and Neural Biology*, 29(3), 405-409. doi:10.1016/S0163-1047(80)90430-6
doi:10.1016/S0163-1047(80)90430-6
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281-290. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.015
- Oliveira, C. P., de Lima Sanches, P., de Abreu-Silva, E. O., y Marcadenti, A. (2016). Nutrition and physical activity in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of diabetes research*, 2016. doi:10.1155/2016/4597246
- 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
- Olton, D. S., Becker, J. T., y Handelmann, G. E. (1979). Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(3), 313-322.
doi:10.1017/S0140525X00062713
- Olton, D. S., Collison, C., y Werz, M. A. (1977). Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Learning and Motivation*, 8(3), 289-314. doi:10.1016/0023-9690(77)90054-6
- Olton, D. S., y Paras, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), 669-682. doi:10.1016/0028-3932(79)90042-3

- Owen, A. M., Morris, R. G., Sahakian, B. J., Polkey, C. E., y Robbins, T. W. (1996). Double dissociations of memory and executive functions in working memory tasks following frontal lobe excisions, temporal lobe excisions or amygdalo-hippocampectomy in man. *Brain*, 119(5), 1597-1615. doi:10.1093/brain/119.5.1597
- Paxinos, G., Watson, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*. Academic Press.
- Pinçon, A., De Montgolfier, O., Akkoyunlu, N., Daneault, C., Pouliot, P., Villeneuve, L., ... Ruiz, M. (2019). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, and the Underlying Altered Fatty Acid Metabolism, Reveals Brain Hypoperfusion and Contributes to the Cognitive Decline in APP/PS1 Mice. *Metabolites*, 9(5), 104. doi:10.3390/metabo9050104
- Rolls, E. T., y Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, 79(1), 1-48. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.04.005
- Sáez-Lara, M. J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Diaz, J., y Gil, A. (2016). Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: a review of human clinical trials. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 928. doi:10.3390/ijms17060928
- Salz, D. M., Tiganj, Z., Khasnabish, S., Kohley, A., Sheehan, D., Howard, M. W., y Eichenbaum, H. (2016). Time cells in hippocampal area CA3. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7476-7484. doi:10.1523/JNEUROSCI.0087-16.2016
- Seo, S. W., Gottesman, R. F., Clark, J. M., Hernaez, R., Chang, Y., Kim, C., ... Lazo, M. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with cognitive function in adults. *Neurology*, 86(12), 1136-1142. doi:10.1212/WNL.0000000000002498
- Thomsen, K. L., Grønbaek, H., Glavind, E., Hebbard, L., Jessen, N., Clouston, A., ... Vilstrup, H. (2014). Experimental nonalcoholic steatohepatitis compromises ureagenesis, an essential hepatic metabolic function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(3), G295-G301. doi:10.1152/ajpgi.00036.2014

- Van Rooyen, D. M., Larter, C. Z., Haigh, W. G., Yeh, M. M., Ioannou, G., Kuver, R., ... Farrell, G. C. (2011). Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, *141*(4), 1393-1403. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.040
- Veniaminova, E., Cespuglio, R., Cheung, C. W., Umriukhin, A., Markova, N., Shevtsova, E., ... Strelakova, T. (2017). Autism-Like Behaviours and Memory Deficits Result from a Western Diet in Mice. *Neural Plasticity*, 2017. doi:10.1155/2017/9498247
- Vernon, G., Baranova, A., y Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary pharmacology y therapeutics*, *34*(3), 274-285. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x
- Weinstein, A. A., Kallman Price, J., Stepanova, M., Poms, L. W., Fang, Y., Moon, J., ... Younossi, Z. M. (2011). Depression in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Chronic Viral Hepatitis B and C. *Psychosomatics*, *52*(2), 127-132. doi:10.1016/j.psym.2010.12.019
- Weinstein, A. A., de Avila, L., Paik, J., Golabi, P., Escheik, C., Gerber, L., y Younossi, Z. M. (2018). Cognitive Performance in Individuals With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and/or Type 2 Diabetes Mellitus. *Psychosomatics*, *59*(6), 567-574. doi:10.1016/j.psym.2018.06.001
- Weinstein, G., Zelber-Sagi, S., Preis, S. R., Beiser, A. S., DeCarli, C., Speliotes, E. K., ... Seshadri, S. (2018). Association of nonalcoholic fatty liver disease with lower brain volume in healthy middle-aged adults in the Framingham study. *JAMA neurology*, *75*(1), 97-104. doi:10.1001/jamaneurol.2017.3229
- Wong-Riley, M. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in neurosciences*, *12*(3), 94-101. doi:10.1016/0166-2236(89)90165-3
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., y Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic

assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73-84.
doi:10.1002/hep.28431

Zorzo, C., Méndez-López, M., Méndez, M., y Arias, J. L. (2019). Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behavioural brain research*, 365, 170-177. doi:10.1016/j.bbr.2019.03.011