

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Facultad de Psicología



Máster en Investigación en Neurociencias

CURSO 2022-2023

**EFECTO DE LA DIETA ALTA EN GRASAS
SOBRE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA**

Trabajo empírico

Mónica Díaz Barredo

Oviedo, junio de 2023

Resumen

El eje intestino-hígado-cerebro es una vía bidireccional de comunicación entre estos tres órganos. Alteraciones en la misma pueden causar patologías a cualquier nivel del eje. Un claro ejemplo son modificaciones en la microbiota intestinal, que tienen como consecuencia la producción de moléculas que afectan tanto al cerebro como al hígado. La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una patología asociada con la disbiosis intestinal, y puede ser inducida por una dieta alta en grasas y colesterol (HFHC). El objetivo de este trabajo es analizar el impacto de este tipo de dietas sobre las células de microglía. Para ello doce ratas fueron divididas en dos grupos: el primero sometido a una dieta estándar (NC) y el segundo a una dieta HFHC. Tras 14 semanas se extrajeron los cerebros de los animales y se obtuvieron secciones que posteriormente fueron teñidas mediante técnicas inmunocitoquímicas. Se cuantificó el número de células de microglía en seis regiones: cíngulo, prelímbico, infralímbico, CA1, CA3 y giro dentado. Posteriormente se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos mediante pruebas t de Student para muestras independientes. Se observa un aumento significativo del número de células en el grupo HFHC con respecto al NC en las regiones del prelímbico e infralímbico.

Abstract

The gut-liver-brain axis is a bidirectional communication pathway between these three organs. Alterations in it may cause pathologies at any level of the axis. A clear example are changes in the gut microbiota, which result in the production of molecules that affect both brain and liver. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a pathology associated with intestinal dysbiosis, and can be induced by a high-fat high-cholesterol diet (HFHC). The aim of this study is to analyze the impact of this type of diet on microglial cells. Twelve rats were divided into two groups: the first one was subjected to a standard diet (NC) and the second to a HFHC diet. After 14 weeks, the brains of the animals were removed. Sections were obtained and subsequently stained by immunocytochemical techniques. The number of microglial cells was quantified in six regions: cingulate, prelimbic, infralimbic, CA1, CA3 and dentate gyrus. The results were analyzed by t-Student for independent samples. A significant increase in the

number of cells was observed in the HFHC group compared to NC in the prelimbic and infralimbic regions.

Palabras clave

EHNA, microglía, HFHC, eje intestino-hígado-cerebro

Keywords

NASH, microglia, HFHC, gut-liver-brain axis

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Yo, D.^a Mónica Díaz Barredo, estudiante del Máster en Investigación en Neurociencias de la Facultad de Psicología, Universidad de Oviedo, con DNI nº 71787072R.

Declaro que:

El presente trabajo Fin de Máster, titulado: “Efectos de la dieta alta en grasas sobre las células de microglía”, que presento para exposición y defensa, es original y he citado debidamente todas las fuentes de información utilizadas, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía.

En Oviedo, a 9 de junio de 2023.

Abreviaturas

PBS	Tampón fosfato salino, del inglés phosphate buffered saline
CG	Cingulado
PL	Córtex prelímbico
IL	Córtex infralímbico
CA1, CA3	Subcampos del hipocampo
DG	Giro dentado
TBS	Solución salina tamponada con Tris
BSA	Albúmina de suero bovina, del inglés bovine serum albumin
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
NC	Dieta normal, del inglés normal chow
HFHC	Dieta alta en grasas y colesterol, del inglés high-fat, high cholesterol diet

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	7
	1.1 Eje intestino-hígado-cerebro	7
	1.2 Esteatohepatitis no alcohólica	8
	1.3 Células de microglía y dieta grasa	9
2.	OBJETIVO	11
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
	3.1 Animales	11
	3.2 Obtención de tejidos	11
	3.3 Preparación de tejidos.....	12
	3.4 Inmunocitoquímica: Iba-1	12
	3.5 Recuento celular: Iba-1.....	12
	3.6 Análisis estadístico	13
4.	RESULTADOS	13
5.	DISCUSIÓN	16
6.	CONCLUSIONES	18
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Eje intestino-hígado-cerebro

El eje intestino-hígado-cerebro es una vía de comunicación bidireccional, basada en señales tanto neuronales como hormonales, que se producen entre el sistema nervioso central y periférico, y el hígado, el intestino y la microbiota intestinal. Esta vía es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Alteraciones en la misma tienen como consecuencia la aparición de patologías neurológicas, hepáticas e intestinales (1).

Hígado e intestino se encuentran conectados a través de la vena porta, el tracto biliar y la circulación sistémica. Los productos intestinales afectan a la función hepática, del mismo modo que las sales biliares y moléculas antimicrobianas transportadas desde el hígado al intestino ayudan al correcto mantenimiento de la microbiota. Por este motivo, las disbiosis intestinales pueden provocar daños metabólicos a nivel de hígado. A su vez, hígado e intestino se comunican con el cerebro principalmente a través del nervio vago, pero también a través de vías endocrinas y mediante el sistema inmunológico. (2,3).

1.1.1 Intestino-cerebro

La generación de animales de investigación sin microbiota intestinal permitió observar por primera vez las alteraciones a nivel neural que esta situación producía, e impulsó el estudio de la relación entre microbiota intestinal y cerebro. A día de hoy se sabe que el intestino es capaz de influir en el cerebro, y el cerebro a su vez influye sobre la microbiota intestinal y el funcionamiento del propio intestino. Este eje se comunica mediante diversos mecanismos:

En el caso de la información ascendente, intestino-cerebro, existen principalmente tres vías: señalización neuronal, señalización enteroendocrina y señalización inmunológica. Las células enteroendocrinas pueden establecer contactos con la microbiota y con las moléculas generadas por la misma a través de receptores, como pueden ser los receptores tipo Toll. En respuesta a estas interacciones producirán hormonas peptídicas y citoquinas, que van a participar en la vía neural (2). Dentro de la vía neural cabe destacar el nervio vago. No establece comunicación directa con la microbiota, pero presenta receptores para determinadas moléculas generadas en la vía

enteroendocrina. Estos receptores pueden verse afectados por el estado nutricional o la dieta (4). Por su parte, la microbiota genera diversas moléculas a partir del procesamiento de los alimentos ingeridos. Cabe destacar los ácidos grasos de cadena corta, capaces de estimular al nervio vago, activando la vía neural, y además promueven la producción de neurotransmisores, como la serotonina, en el colon (4,5).

Si la información es descendente, cerebro-intestino, nos encontramos con dos situaciones: una ruta neuroendocrina que implica al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, liberándose corticosteroides, y una vía neural, a través de reflejos mediados nuevamente por el nervio vago (4).

A día de hoy se sabe que alteraciones en este eje juegan un papel fundamental en distintas patologías, como es el caso del hígado graso no alcohólico (6).

1.2 Esteatohepatitis no alcohólica

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es un tipo de patología que se encuentra dentro del espectro del hígado graso no alcohólico (NAFLD), y está muy asociada con problemas de sobrepeso y obesidad u otros trastornos metabólicos. Actualmente es una de las enfermedades más prevalentes del mundo. Afecta tanto a niños como a adultos, y su desarrollo puede dar lugar a otras patologías que revisten mayor gravedad, como la cirrosis o el cáncer hepático primario (7).

Se ha observado que la administración de dietas altas en grasas y colesterol a ratones conduce a la aparición de esteatohepatitis no alcohólicas, y eventualmente a carcinomas hepatocelulares. Estos fenómenos se han asociado a la aparición de disbiosis en la microbiota intestinal, con la consecuente alteración de los metabolitos bacterianos, a partir de la alimentación con este tipo de dieta (8).

Se ha demostrado además que los pacientes que sufren EHNA presentan un aumento en los niveles de ácidos biliares presentes en heces, especialmente ácidos biliares primarios, así como un aumento hepático de la síntesis de los mismos. Estos datos se correlacionan con la disbiosis intestinal (9). Además, una de las consecuencias de esta afección es la aparición de disfunciones a nivel cerebral, a partir de la alteración de los receptores de ácidos biliares, como pueden ser FXR y TGR5, que tiene como resultado un aumento de la permeabilización de la barrera hematoencefálica, cuya consecuencia es una mayor predisposición a la neuroinflamación (10).

Higarza *et al.* (2019) han publicado un artículo en el que trabajaban sobre ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y colesterol, cuyo contenido era de 65% de kcal de grasas, un 2% de kcal de colesterol, y un 0.5% de colato, en comparación con ratas alimentadas con pienso normal. Las primeras conformaban un grupo modelo de EHNA. El objetivo de este estudio era ampliar el conocimiento existente sobre los efectos de este tipo de alimentación sobre el eje intestino-hígado-cerebro en esta patología. Para ello realizaron evaluaciones comportamentales a los animales, así como análisis de la microbiota en heces, determinaciones bioquímicas en plasma y exámenes histológicos de hígado. Como resultado se observó la aparición de disbiosis intestinales y una menor producción de ácidos grasos de cadena corta, así como déficits en las habilidades cognitivas de estos animales. Sin embargo, el papel de la inflamación en el deterioro cognitivo, que aparece tras la disbiosis intestinal, aún no está claro. (11).

Un estudio publicado por Ledreux *et al.* (2016) comprueba la aparición de esta inflamación. Utilizaron dos grupos de ratas, jóvenes y de edad avanzada, alimentadas con una dieta rica en grasas y colesterol (15% de proteína, 36% grasas, 49% carbohidratos) en comparación con otros dos grupos, nuevamente jóvenes y de edad avanzada, alimentados con pienso normal (34% proteína, 13% grasa, 53% carbohidrato). El objetivo de este estudio era analizar los efectos a largo plazo de la dieta alta en grasas y colesterol sobre la morfología hipocampal y la inflamación, así como el desempeño cognitivo. Para ello se sometió a los animales a pruebas de memoria espacial, y posteriormente se analizó la cantidad de células de microglía activadas en el hipocampo mediante inmunohistoquímica. Los resultados mostraron un aumento de la activación de las células de microglía en el hipocampo, tanto en ratas jóvenes como en ratas de edad avanzada, así como una memoria espacial empeorada (12).

1.3 Células de microglía y dieta grasa

Las células de microglía son las células inmunes propias del sistema nervioso central. Son capaces de detectar multitud de señales extracelulares, que posteriormente integran para generar una respuesta que permita mantener la homeostasis cerebral. Sin embargo, una activación excesiva de estas células, o una respuesta descontrolada, se ha visto asociada con la neurodegeneración y la disfunción neuronal (13). Actualmente se

sabe que los lípidos consumidos con la dieta afectan a las funciones normales de la microglía a través de dos mecanismos: De forma directa, mediante receptores sensibles a ácidos grasos saturados, que inician procesos inflamatorios; y de forma indirecta, a partir de metabolitos secundarios procedentes de la microbiota (Imagen 1). (14,15).

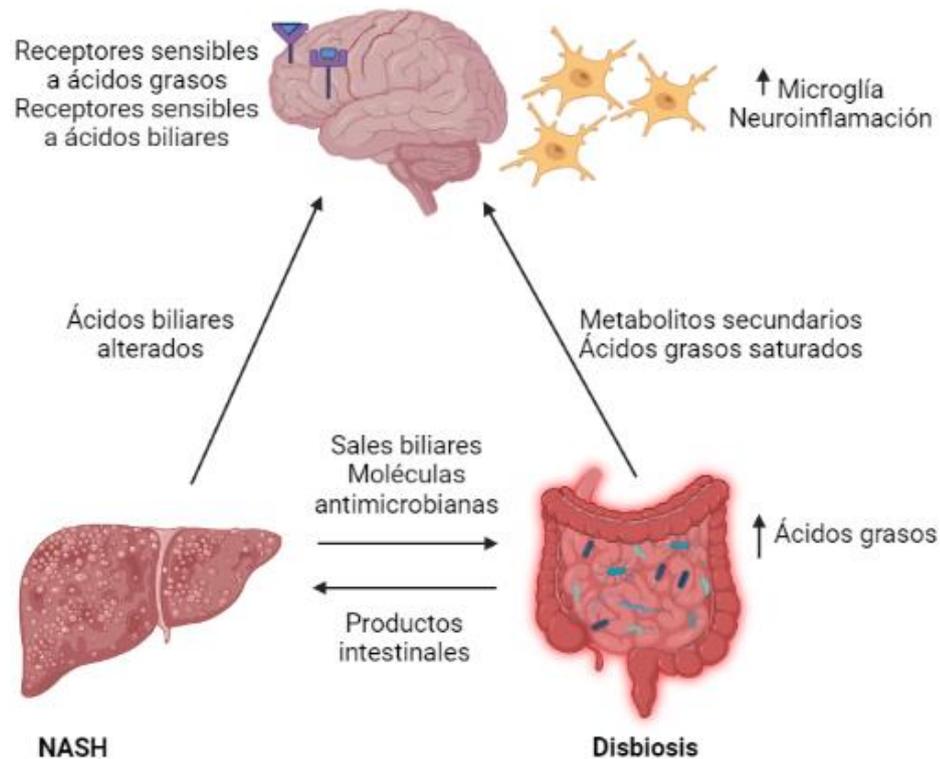


Imagen 1: Eje intestino-hígado-cerebro en situación patológica. Relación entre la disbiosis intestinal con la aparición de EHNA, y a su vez inflamación cerebral por aumento de la activación de las células de microglía. Creado con BioRender.com

Otro de los efectos de los lípidos sobre estas células está causado por los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6. Se realizó un estudio con ratas alimentadas con una dieta deficiente en ácidos grasos omega 3, en comparación con otro grupo alimentado con una dieta equilibrada en omega 3 y omega 6, con el objetivo de determinar los efectos del desbalance dietético sobre el giro dentado del hipocampo en animales adultos, y las células implicadas en respuesta inflamatoria, la microglía. Los resultados mostraron una mayor susceptibilidad por parte de las hembras, en las que se observaron alteraciones morfológicas en el giro dentado del hipocampo, que se acompañan de una reducción del número de células de microglía (16).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es analizar el impacto de una dieta alta en ácidos grasos y colesterol sobre las células de microglía, centrándonos en dos áreas cerebrales donde se ha visto previamente mayor afectación: el hipocampo y el área prefrontal de la corteza.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales

Doce ratas macho Sprague-Dawley (Envigo, United Kingdom) fueron divididas en dos grupos (n=6) por cada grupo experimental: Dieta normal (NC) o dieta alta en grasas y colesterol (HFHC). La dieta normal contenía un 13% de kcal de grasas, y nada de colesterol (Envigo, United Kingdom – 2914), mientras que la EHNA fue inducida mediante una dieta alta en grasas y colesterol (HFHC) (Research Diets, USA – D09052204), que contiene un 65% de kcal de grasas y un 2% de kcal de colesterol. Ambos grupos se estudiaron tras 14 semanas siguiendo sus respectivas dietas. Los animales disponían de agua corriente ad libitum, y fueron mantenidos a una temperatura ambiente estable ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), con un nivel de humedad relativo de $65 \pm 5\%$, y un ciclo artificial de luz/oscuridad de 12 horas h (08:00–20:00/20:00–08:00 h). Todos los procedimientos y la manipulación de los animales utilizados en este estudio fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva Europea (2010/63/EU), y el Real Decreto 53/2013 del Ministerio de Agricultura en relación a la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (17).

3.2 Obtención de tejidos

En primer lugar, se sometió a los animales a anestesia profunda mediante la administración de una combinación de 80 mg/kg de ketamina (100 mg/ml, Imalgene®, Merial, y 10 mg/kg de xilacina (20 mg/ml Rompun®, Bayer). A continuación, se les inyectaron 0,1 mL de heparina (Hospira®) en el ventrículo izquierdo, para evitar la coagulación sanguínea. Se conectó este mismo ventrículo a una bomba de perfusión vascular (Ismatec corp. España), que permitió la infusión de una solución salina al 0.9% durante cinco minutos, y posteriormente paraformaldehído al 4% en un tampón fosfato salino (PBS), a pH 7.4, durante veinte minutos. Por último, se realizó la extracción del cerebro de cada animal y se seccionaron a lo largo de la cisura interhemisférica (17).

3.3 Preparación de tejidos

Una vez extraídas, las muestras de cerebro fueron sumergidas en una solución de paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4) durante doce horas. A continuación, se transfirieron a una preparación de PBS con un 30% de sacarosa (0.1M, pH 7.4) hasta que quedaron completamente sumergidas, entre 24 y 48 horas. Después se deshidrataron los tejidos utilizando concentraciones crecientes de etanol durante 30 minutos en cada una (70%, 80%, 96% x 2, 100% x 2). Finalizado este proceso se transfirieron a acetato de n-butilo y a continuación se introdujeron en parafina a 37°C durante dos horas, para ser mantenidos a continuación en estas condiciones toda la noche. A la mañana siguiente los cerebros se embebieron en parafina. Utilizando un microtomo (Leica, RM2135, Germany) se realizaron secciones coronales de 20 µm de grosor, que se montaron en un portaobjetos para la aplicación posterior de técnicas de inmunocitoquímica, concretamente Iba-1 (17).

3.4 Inmunocitoquímica: Iba-1

Esta técnica fue llevada a cabo en seis regiones cerebrales: área media de la corteza prefrontal (cingulado (CG), córtex prelímbico (PL) e infralímbico (IL)) y subcampos del hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado (DG)). Las secciones coronales de estas regiones cerebrales fueron localizadas mediante la utilización de un atlas estereotáxico de rata. Las distancias desde el punto bregma fueron aproximadamente +3.20 mm en IL, PL y CG, y + 4.16 mm en el caso del CA1, CA3 y DG (18).

Las secciones se desparafinaron y se lavaron con solución salina tamponada con Tris (TBS) con Tritón X-100 al 0.1%. Se bloquearon con suero humano y a continuación se incubaron durante toda la noche con anticuerpo policlonal primario, concretamente Anti-Iba-1 de conejo (Fujifilm Wako chemicals Europe, 1:480 en BSA). A la mañana siguiente se lavaron nuevamente con TBS y Tritón X-100 y se incubaron, en este caso con anticuerpo secundario biotinilado (Pierce, IgG anti-rabbit de cabra, 1:30 en BSA). Por último se añadió el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Thermo Fisher Vectastain Ultra-Sensitive ABC Staining Kit), se reveló con tetracloruro de diaminobencidina y finalmente se cubrieron las secciones (17).

3.5 Recuento celular: Iba-1

Se realizó un recuento de células inmunorreactivas. Para ello se utilizaron seis secciones distintas, separadas entre sí por 20 μm . Entre estas secciones se encontraban CG, PL, IL, CA1, CA3 y DG. Las secciones coronales de estas regiones cerebrales se localizaron mediante un atlas estereotáxico de rata (18) como se especificó anteriormente.

Para la cuantificación se realizó un muestreo sistemático, en que se utilizaron cuadrantes de recuento superpuestos a cada región seleccionada. Para ello se emplearon cuatro marcos de muestreo equidistantes (tamaño del marco 0,050 mm x 0,100 mm). Los recuentos se llevaron a cabo mediante un microscopio óptico, con un objetivo de aumento 10x y 40x (Leica DFC490, Alemania), acoplado a un ordenador con software (Leica application suite, Alemania). Las células inmunorreactivas para Iba-1 únicamente se tuvieron en cuenta para el recuento si el cuerpo celular se encontraba en el cuadrante. Para cada sección el grosor total analizado fue de 10 μm , omitiendo aquellas células que se situasen sobre los márgenes izquierdo y superior, para evitar cualquier posible sobreestimación. Por último, se calculó la media del recuento de tres secciones (12 cuadrantes por área, y seis ratas por grupo) para cada estructura cerebral (17).

3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SigmaStat software versión 3.2 (Systat, Richmond, EE.UU). Para todos los valores medidos se consideró significancia cuando el valor de $p < 0.050$. En las pruebas inmunocitoquímicas se analizaron seis ratas por grupo, y se calculó el número de células promedio para cada sección cerebral. La media fue empleada en el análisis. Se utilizó una prueba t de Student para muestras independientes.

4. RESULTADOS

En primer lugar, se llevó a cabo una prueba t- Student para muestras independientes donde se compararon el número de células de microglía detectadas en cada región cerebral entre el grupo control (animales alimentados con una dieta estándar, NC), y el grupo experimental (animales alimentadas con una dieta alta en grasas y colesterol, HFHC) (Tabla 1). Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo en el grupo HFHC en comparación con el NC en la

corteza prelámbica ($t_{22} = 2.943$; $p = 0.008$) y la corteza infralámbica ($t_{22} = 3.351$; $p = 0.003$). Por el contrario, en la región del cíngulo no se encontraron diferencias significativas ($t_{22} = 1.013$; $p = 0.322$) (Figura 1).

En cuanto al área hipocámpal, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupo control y grupo experimental en ninguna de las regiones: CA1 ($t_{13} = 1.151$; $p = 0.883$), CA3 ($t_{13} = 0.423$; $p = 0.679$) y DG ($t_{13} = 0.315$; $p = 0.758$) (Figura 2). Por tanto, la dieta parece no afectar a la activación de las células de microglía en este área cerebral.

Región cerebral	NC	HFHC
CG	136.928 ± 15.933	158.583 ± 15.568
PL	101.750 ± 13.706	150.083 ± 9.046*
IL	94.250 ± 12.740	156.167 ± 13.386*
CA1	154.000 ± 6.077	151.000 ± 15.539
CA3	148.833 ± 6.199	140.889 ± 14.608
DG	7.333 ± 2.060	6.556 ± 1.482

Tabla 1: Recuento de células de microglía en las distintas regiones cerebrales en grupo control (NC) y grupo experimental (HFHC). Los datos se representan como la media ± desviación estándar (SEM). * $p < 0.05$.

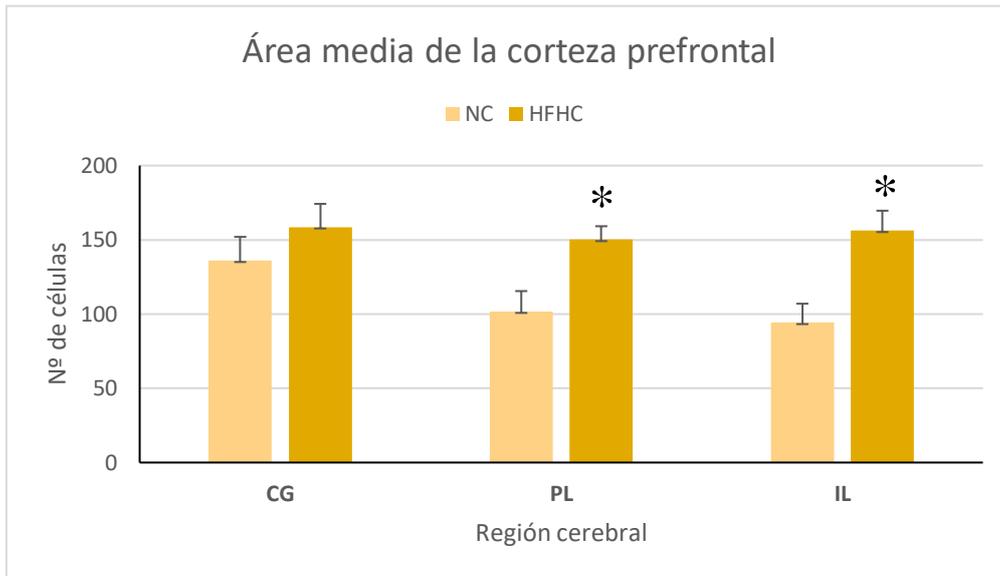


Figura 1: Recuento de células de microglía en tres regiones (CG, PL e IL) del área media de la corteza prefrontal, donde se compara el grupo control (NC) con el grupo experimental (HFHC). * $p < 0.05$

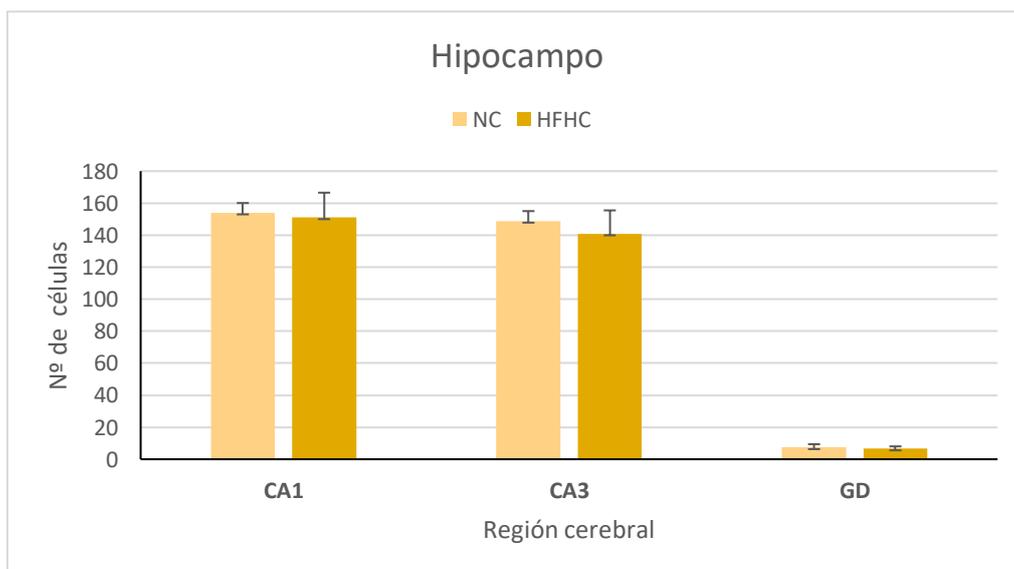


Figura 2: Recuento de células de microglía en tres regiones (CA1, CA3 y DG) del hipocampo, donde se compara el grupo control (NC) con el grupo experimental (HFHC).

Asimismo, analizamos la media del total de células de microglía en cada grupo experimental, teniendo en cuenta todas las regiones estudiadas. Como resultado obtenemos una diferencia estadísticamente significativa ($t_{37} = 2.522$; $p = 0.0132$) siendo el grupo sometido a una dieta HFHC el que presenta un mayor número de células gliales, en comparación con el grupo alimentado con una dieta NC (Tabla 2).

Grupo experimental	N° células
NC	107.032 ± 6.001
HFHC	127.213 ± 5.292*

Tabla 2: Recuento de células de microglía en grupo control (NC) y grupo experimental (HFHC). Los datos se representan como la media ± desviación estándar. * p<0.05

5. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la composición de la dieta afecta a la activación de las células de microglía, de modo que se produce un aumento del número de células detectadas en aquellos animales tratados con una dieta alta en grasas y colesterol respecto a un grupo control, alimentado con una dieta estándar. Este incremento es especialmente significativo en el caso del área media de la corteza prefrontal, concretamente en las regiones del prelímbico e infralímbico. Estos datos complementan los obtenidos previamente por otros investigadores. Es el caso del estudio realizado por Bocarsly *et al.* (2015), en el que se estudiaron ratas a las que se les indujo obesidad, mediante una dieta alta en grasas, frente a ratas alimentadas con pienso estándar, y posteriormente se analizaron los cambios en la morfología de las células de microglía mediante técnicas inmunohistoquímicas. Como resultado observaron que en la corteza prefrontal se producía una mayor activación de la microglía en los sujetos sometidos a una dieta alta en grasas, determinado por un aumento en la longitud de las prolongaciones celulares (19). Con nuestro estudio hemos podido comprobar que a este alargamiento de las prolongaciones, ya descrito, se suma un aumento en el número de células de microglía en este área cerebral.

Por otra parte, Higarza *et al.* (2019) han estudiado previamente los efectos neuroconductuales en modelos EHNA, y su asociación con la hiperamonemia, la disbiosis intestinal y déficits a nivel metabólico y regional en el cerebro. Para ello sometieron a los animales a la misma dieta (HFHC vs NC) que en el presente trabajo, durante el mismo periodo de tiempo (14 semanas). En cuanto a las funciones cognitivas, sus resultados muestran que el grupo experimental, sometido a una dieta HFHC preservaba la memoria de referencia espacial y memoria a largo plazo, dependiente del hipocampo, ya que no se encontraron diferencias significativas frente al grupo control.

Sin embargo, otras funciones asociadas a la corteza prefrontal, como es la memoria a corto plazo, evaluada mediante la memoria espacial de trabajo, sí se veía afectada en aquellos sujetos con una dieta HFHC (11). En nuestro caso detectamos un aumento en el número de células de microglía en la corteza prefrontal, por lo que sería interesante en futuros estudios comprobar si efectivamente este aumento en la activación de la microglía es causante del deterioro cognitivo, o si, por el contrario, es el deterioro cognitivo el que tiene como consecuencia un aumento del número de células de microglía.

En cuanto al área hipocampal, nuestros resultados no muestran diferencias entre el grupo HFHC y el NC en ninguna de las tres regiones analizadas (CA1, CA3 y DG). Estos datos parecen contradecir a los obtenidos por Ledreux *et al.* (2016), cuyo trabajo muestra un aumento en la activación de células de microglía en el hipocampo (CA1, CA3 y DG) en aquellos animales sometidos a una dieta rica en grasas y colesterol. En su estudio cada grupo estuvo expuesto a su dieta durante seis meses (12), mientras que en nuestro caso este tiempo fue de 14 semanas. Las diferencias observadas podrían explicarse por la diferente composición de la dieta (15% de proteína, 36% grasas, 49% carbohidratos frente a 65% de kcal de grasas y un 2% de kcal de colesterol en el caso de nuestro estudio) o dada la diferencia en el tiempo de tratamiento al que se vieron expuestos los sujetos (14 semanas frente a 6 meses). Es posible que este tipo de dietas afecten en estadios tempranos a estructuras prefrontales, como se ha visto tanto a nivel neuroconductual (11) como en relación al número de células de microglía, que sería el caso de los datos obtenidos en nuestro estudio. De este modo, las áreas cerebrales subcorticales, como el hipocampo, se verían afectadas en estadios más avanzados, lo que explicaría las diferencias encontradas entre esta investigación y otras ya existentes. Esta teoría se ve apoyada por el artículo publicado por Veniaminova *et al.* (2020) donde los sujetos se sometieron a una dieta occidental (0.2% colesterol, 21% grasas) durante tres semanas, y al igual que el presente estudio, se observó un aumento en el número de células de microglía en la corteza prefrontal, pero no en el hipocampo (20). Asimismo, como mencionábamos anteriormente, las funciones cognitivas dependientes del hipocampo se encuentran preservadas a las 14 semanas en sujetos alimentados con una dieta HFHC, al igual que aquellos que siguieron una dieta NC (11).

Por otra parte, nuestros resultados permiten avanzar en el conocimiento existente sobre la evolución y el desarrollo de una enfermedad tan prevalente como la EHNA. Estudios previos muestran una reducción del peso cerebral en sujetos con esta patología, así como un aumento en el tamaño del hígado y alteraciones cognitivas (21). Dada la estrecha relación entre intestino, hígado y cerebro, cabe pensar que el aumento en el número de células de microglía a nivel cerebral juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la EHNA. De cara a futuros estudios sería interesante incidir en estas respuestas neuroinflamatorias en distintos estadios de la enfermedad, analizando no solo el incremento en el número de células, sino también su estado de activación, con el objetivo de comprender mejor la relación entre ambos sucesos.

En resumen, nuestro estudio muestra una respuesta selectiva de las células de microglía frente a una dieta alta en grasas y colesterol, con un aumento en la cantidad de células en regiones de la corteza prefrontal (PL e IL). Dada la importancia de la microglía en el mantenimiento de la función cerebral y en las respuestas inflamatorias, comprender cómo afecta la dieta a estas células puede ayudar a entender el desarrollo de patologías como el EHNA y, posteriormente, identificar posibles dianas terapéuticas a lo largo del desarrollo de dicha patología.

6. CONCLUSIONES

1. Las distintas regiones cerebrales responden de manera diferencial a la dieta HFHC, de manera que la cantidad de microglía varía de una región a otra.
2. La microglía presente en las regiones de la corteza prefrontal, prelímbico e infralímbico, se ven afectadas en estadios tempranos de exposición a una dieta HFHC.
3. Los animales sometidos a una dieta HFHC tienen un mayor número de células de microglía en comparación con los sujetos expuestos a una dieta NC.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrell JM, Chiang JYL. Bile acid receptors and signaling crosstalk in the liver, gut and brain. *Liver Res.* septiembre de 2021;5(3):105-18.

2. Ding JH, Jin Z, Yang XX, Lou J, Shan WX, Hu YX, et al. Role of gut microbiota via the gut-liver-brain axis in digestive diseases. *World J Gastroenterol*. 28 de octubre de 2020;26(40):6141-62.
3. Matsubara Y, Kiyohara H, Teratani T, Mikami Y, Kanai T. Organ and brain crosstalk: The liver-brain axis in gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases. *Neuropharmacology*. marzo de 2022;205:108915.
4. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat Rev Neurosci*. agosto de 2011;12(8):453-66.
5. Reigstad CS, Salmons CE, Iii JFR, Szurszewski JH, Linden DR, Sonnenburg JL, et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J*. abril de 2015;29(4):1395-403.
6. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut–Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children*. 2 de agosto de 2017;4(8):66.
7. Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 23 de noviembre de 2017;377(21):2063-72.
8. Zhang X, Coker OO, Chu ES, Fu K, Lau HCH, Wang YX, et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. *Gut*. abril de 2021;70(4):761-74.
9. Mouzaki M, Wang AY, Bandsma R, Comelli EM, Arendt BM, Zhang L, et al. Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Aspichueta P, editor. *PLOS ONE*. 20 de mayo de 2016;11(5):e0151829.
10. Fiaschini N, Mancuso M, Tanori M, Colantoni E, Vitali R, Diretto G, et al. Liver Steatosis and Steatohepatitis Alter Bile Acid Receptors in Brain and Induce Neuroinflammation: A Contribution of Circulating Bile Acids and Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 17 de noviembre de 2022;23(22):14254.

11. Higarza SG, Arboleya S, Gueimonde M, Gómez-Lázaro E, Arias JL, Arias N. Neurobehavioral dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis is associated with hyperammonemia, gut dysbiosis, and metabolic and functional brain regional deficits. Reichmann F, editor. PLOS ONE. 20 de septiembre de 2019;14(9):e0223019.
12. Ledreux A, Wang X, Schultzberg M, Granholm AC, Freeman LR. Detrimental effects of a high fat/high cholesterol diet on memory and hippocampal markers in aged rats. Behav Brain Res. octubre de 2016;312:294-304.
13. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. Nat Med. septiembre de 2017;23(9):1018-27.
14. Leyrolle Q, Layé S, Nadjar A. Direct and indirect effects of lipids on microglia function. Neurosci Lett. agosto de 2019;708:134348.
15. Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. Cell Rep. diciembre de 2014;9(6):2124-38.
16. Rodríguez-Iglesias N, Nadjar A, Sierra A, Valero J. Susceptibility of Female Mice to the Dietary Omega-3/Omega-6 Fatty-Acid Ratio: Effects on Adult Hippocampal Neurogenesis and Glia. Int J Mol Sci. 21 de marzo de 2022;23(6):3399.
17. Banqueri M, Méndez M, Gómez-Lázaro E, Arias JL. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. Stress. 3 de septiembre de 2019;22(5):563-70.
18. Paxinos, G; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5, ed. London: Elsevier Academic Press; 2005.
19. Bocarsly ME, Fasolino M, Kane GA, LaMarca EA, Kirschen GW, Karatsoreos IN, et al. Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. Proc Natl Acad Sci. 22 de diciembre de 2015;112(51):15731-6.

20. Veniaminova E, Oplatchikova M, Bettendorff L, Kotenkova E, Lysko A, Vasilevskaya E, et al. Prefrontal cortex inflammation and liver pathologies accompany cognitive and motor deficits following Western diet consumption in non-obese female mice. *Life Sci.* enero de 2020;241:117163.
21. Higarza SG, Arboleya S, Arias JL, Gueimonde M, Arias N. The gut–microbiota–brain changes across the liver disease spectrum. *Front Cell Neurosci.* 7 de septiembre de 2022;16:994404.