

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en
Ciencias Biológicas

“EFECTOS PROTECTORES DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE LA OBESIDAD”

Lic. Schumacher Rocio

Director de Tesis: Dr. Ramos J. Guillermo

Co-directora de Tesis: Dra. Andreoli M. Florencia

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL – CONICET)

Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa (FBCB-UNL)

Santa Fe

-2023-

Agradecimientos

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral**, por permitirme desarrollarme y crecer como profesional y como persona a lo largo de mi carrera de grado postgrado.

A **CONICET**, por haberme otorgado la beca interna de posgrado que me permitió realizar el Doctorado y formarme profesionalmente.

A el **Dr. Jorgue Guillermo Ramos** y la **Dra. Ma. Florencia Andreoli**, directores de este trabajo de tesis, por darme la posibilidad de realiza un doctorado en sus líneas de investigación y su lugar de trabajo. Además, por haberme guiado en este proceso con paciencia y dedicación, aportando su sabiduría para formarme y poder realizar este trabajo de investigación.

A mi grupo incondicional, **las chicas de Bioquímica Clínica**, Flor, Luisa, Guilli, Ani, Pame, Juli, Emi, Cori, Adri y Ale, con quienes he tenido la fortuna de compartir este trabajo, les agradezco por todas charlas, los abrazos, las risas y llantos compartidos, por ayudarme y apoyarme siempre.

Al **Dr. Enrique H. Luque** y la **Dra. Monica Muñoz de Toro**, por haber creado el ISAL (UNL-CONICET) y darme también lugar para poder desarrollar mi trabajo de investigación. A todos mis **compañeros del ISAL** que siempre con buena predisposición me ayudaron y apoyaron cuando lo necesité.

A **mi familia**, Mamá, Papá y Hermana, quienes siempre me incentivaron a seguir mis sueños acompañándome a cada paso, apoyándome siempre con una palabra de aliento y creyendo en mi incluso cuando yo no creía. Todo lo que soy y mis logros son gracias a ellos, por eso también son sus logros.

A mi compañero, **Daniel**, que siempre me acompaña y apoya en todos mis proyectos. Quien me sostuvo cuando no podía sola y me alentó para llegar a mi meta. Por esto, este trabajo también es un logro de él.

Aportes Científico-Tecnológicos

Schumacher, R., Rossetti, M. F., Lazzarino, G. P., Canesini, G., Garcia, A. P., Stoker, C., Andreoli, M. F., & Ramos, J. G. (2020). Temporary effects of neonatal overfeeding on homeostatic control of food intake involve alterations in POMC promoter methylation in male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111123. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111123>

Índice

1-Abreviaturas y símbolos.....	- 5 -
2- Resumen.....	- 6 -
3- Introducción	- 11 -
4- Hipótesis.....	- 23 -
5- Objetivos del Trabajo	- 24 -
6- Materiales y Métodos	- 25 -
7- Resultados	- 37 -
8- Discusión de Resultados.....	- 54 -
9- Conclusión	- 64 -
10- Bibliografía.....	- 68 -

1-Abreviaturas

AgRP: Péptido relacionado con agouti
AP: Activador Proteico
ARC: Núcleo arcuato
ATV: Área tegmental ventral
CART: Transcripto regulado por cocaína y anfetaminas
CRE: Elemento de respuesta a AMPc
CREB: Proteína de unión a CRE
DA: Dopamina
DAT: Transportador activo de dopamina
DPN: Día postnatal
DRD: Receptor de dopamina
EE: Ambiente enriquecido
GHSR: Receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (Receptor de grelina)
IC: Control interno
IR: Receptor de insulina
L19: Proteína ribosómica 60S L19
MSRE: Enzima de restricción sensible a metilación
NAc: Núcleo accumbens
NL: Camada normal
nPE1: Región potenciadora del promotor de POMC
NPY: Neuropeptido Y
Ob-Rb: Isoforma larga del receptor de leptina
POMC: Pro-opiomelanocortina
SE: Ambiente estándar
SL: Camada reducida
Sp1: Factor de transcripción Sp1
STAT: factor de transcripción codificado por el gen *stat*
TAE: Tejido adiposo epididimal
TH: Tirosina hidroxilasa

2- Resumen

El sobrepeso y la obesidad ha llegado a niveles epidémicos en todo el mundo. Esta condición se da por un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, que también genera muchas otras enfermedades asociadas. Estas problemáticas son cada vez más comunes en etapas tempranas de la vida, con consecuencias tanto en la salud física como psicológica de los niños. Las primeras etapas de la vida son muy vulnerables a condiciones nutricionales y de entorno negativas, aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles a lo largo de la vida. Un modelo animal establecido para el estudio de la sobrealimentación neonatal y la obesidad temprana es criar animales en camadas pequeñas (SL). Este modelo genera menor competencia por el tiempo con la madre, causando mayor consumo de leche y ganancia de peso durante el periodo postnatal temprano. Se sabe también que el entorno donde nos desarrollamos tiene efectos sobre la salud y particularmente el ambiente enriquecido (EE) podría tener efectos que disminuyen el riesgo de desarrollar obesidad. EE es un modelo animal que consiste en una combinación compleja de estimulación inanimada y social aumentada. Comprender los mecanismos cerebrales involucrados en el desarrollo temprano de la obesidad, sus efectos a largo plazo y la influencia del entorno podría ayudarnos a comprender cómo prevenir o reducir la susceptibilidad a desarrollar obesidad en las distintas etapas de la vida. Es por esto que este estudio evaluó los efectos de la sobrealimentación neonatal sobre los circuitos cerebrales del control homeostático y el circuito dopaminérgico mesolímbico como parte del control hedónico de la ingesta en ratas al destete. También, se evaluó si estas alteraciones involucraban mecanismos epigenéticos de regulación y si podían tener efectos en el comportamiento de los animales. Además, todos estos estudios se realizaron en ratas adultas con ambiente estándar (SE) para evaluar cómo la sobrealimentación neonatal puede afectar a largo plazo, y, por otro lado, en ratas adultas con EE para evaluar si éste puede prevenir o revertir los efectos de la sobrealimentación neonatal en la adultez. Para esto, ratas Wistar macho fueron criadas en SL (4 crías/madre) o camadas normales (NL, 10 crías/madre). El día postnatal (DPN) 4 fue elegido como día de reducción de camada para asegurarnos que la lactancia se encontrara completamente establecida. Durante la lactancia se controló el peso corporal semanalmente y, una o dos crías de cada camada fueron sacrificadas en DPN21, generando los grupos experimentales NL-DPN21 (n=7) y SL-DPN21 (n=7). El resto de las crías se dividió en dos grupos que fueron expuestos a dos ambientes diferentes, SE, que consistió en jaulas colectivas estándares de 3 o 4 animales sin objetos; y EE, que consistió en jaulas colectivas de 10 a 14 animales junto con objetos inanimados de diferentes texturas, formas y colores. Se controló el peso corporal y la ingesta

semanalmente, y se realizaron los test de conducta hacia los alimentos. En DPN90 los animales fueron sacrificados para generar los grupos experimentales NL-SE 90 (n=14), SL-SE 90 (n=13), NL-EE 90 (n=14) y SL-EE 90 (n=13). Se obtuvo la sangre troncal, el cerebro que fue congelado rápidamente, y se diseccionó y pesó el tejido adiposo epididimal (TAE). Las regiones núcleo arcuato (ARC), área tegmental ventral (ATV), Núcleo Accumbens Core (NAcC) y Shell (NAcSh) se aislaron individualmente a partir de secciones de cerebro congeladas utilizando un criostato y la técnica de micro-punch de Palkovits. A partir de este tejido, se extrajeron los ácidos nucleicos por medio de TRIzol, la expresión génica se midió por RT-PCRq y los niveles de metilación del ADN se midieron con la técnica MSRM-PCRq. Los animales SL-DPN21 presentaron obesidad, mayor TAE y rasgos característicos del síndrome metabólico al destete. Además, estos animales presentaron una señal anorexigénica que intentaba regularizar el balance energético por medio del sistema leptina/Ob-Rb/POMC con mecanismos epigenéticos sobre el promotor de *Pomc*. Sin embargo, había otra señal orexigénica muy potente mediada por el sistema grelina/GHSR/NPY que mantuvo el balance energético positivo. Por otro lado, los animales SL-DPN21 también presentaron mayor expresión de tirosina hidroxilasa y expresión reducida del transportador activo de dopamina (DAT) en ATV, lo que aumentaría los niveles inter-sinápticos de dopamina (DA). En respuesta a esto, el receptor de DA 2 (DRD2), que regula la síntesis de DA, estaba aumentado en la misma área y DAT, que elimina la DA del espacio sináptico, estaba aumentado en NAcC. En relación con esto, los animales SL-DPN21 presentaron una conducta normal en los test. Estas alteraciones fueron temporales ya que, los animales SL-SE 90 presentaron peso corporal, ingesta y metabolitos en suero normales. Solo el peso del TAE se mantuvo un poco aumentado. Estos animales presentaron una señal orexigénica disminuida, expresión normal de GHSR y regulaciones epigenéticas en el promotor de *Pomc*, justificando la normalización del peso corporal. Por otro lado, los animales SL-SE 90 presentaron menor expresión del receptor de DA 1 (DRD1) y mayor expresión de DAT en NAcSh. Estas alteraciones pueden estar relacionadas con la mayor preferencia por la ingesta de sacarosa que mostraron los animales SL-SE 90 en el test de saciedad sensorial específica. Por otra parte, los animales NL-EE 90 presentaron menor peso corporal y del TAE acompañados de una reducción de la ingesta. Además, estos animales presentaron una señal anorexígena aumentada por incremento del neuropéptido proopiomelanocortina y los receptores hormonales Ob-Rb y IR en ARC. También, los animales NL-EE 90 presentaron un aumento de los receptores hormonales en ATV, que reducirían la activación de neuronas dopaminérgicas reduciendo la ingesta, y una reducción de DRD1 y DRD2 en NAc, que generaría una menor la sensibilidad a la recompensa. Del mismo modo, los animales SL-EE 90 redujeron su peso corporal y

del TAE igualando al grupo NL-SE 90. Además, presentaron una reducción de la ingesta de alimentos que se relacionó con una señal anorexígena aumentada en control homeostático de la ingesta. Además, los animales SL-EE 90 regularizaron las alteraciones observadas en los animales SL-SE 90 en NAcSh y normalizaron el comportamiento hacia los alimentos. Este trabajo demuestra que la camada reducida genera efectos negativos a nivel metabólico y de los sistemas que controlan la ingesta a corto y largo plazo. Sin embargo, el EE logra revertir estos efectos en la adultez. Además, se evidencia la vulnerabilidad de un periodo crítico del desarrollo, como es la lactancia, y se proporciona evidencia de los efectos que la alimentación y el entorno neonatal pueden tener sobre la salud a corto y largo plazo.

Abstract

Overweight and obesity have reached epidemic levels throughout the world. This is caused by an energy imbalance between calories consumed and spent, which also generates many other associated diseases. These problems are increasingly common in early stages of life, with consequences in both the physical and psychological health of these children. The early stages of life are very vulnerable to negative nutritional and environmental conditions, increasing the risk of developing chronic non-communicable diseases throughout life. An established animal model for studying neonatal overfeeding and early obesity is to rear the animals in small litters (SL). This model generates less competition for time spent with the mother and, therefore, greater milk consumption and weight gain during early postnatal period. It is also known that the environment during development has effects on health, and that particularly the enriched environment (EE) could reduce the risk of obesity. EE consists of a complex combination of inanimate objects and increased social stimulation. Understanding the brain mechanisms involved in the early development of obesity, its long-term effects, and the influence of the environment could help us understand how to prevent or reduce susceptibility to obesity at different stages of life. For this reason, this study evaluated the effects of neonatal overfeeding on brain circuitry for homeostatic control and the mesolimbic dopaminergic circuitry as part of hedonic control of food intake in rats at weaning. It was also evaluated if these alterations involved epigenetic regulation mechanisms, and if they could have effects on the behavior of the animals. In addition, all these studies were performed in adult rats with a standard environment (SE) to assess how neonatal overfeeding could affect them in the long term, and, in adult rats with EE to assess whether this type of environment could prevent or reverse the effects of neonatal overfeeding in adulthood. For this, male Wistar rats were reared in SL (4 pups/mother) or normal litters (NL, 10

pups/mother). Postnatal day (PND) 4 was chosen as litter reduction day to ensure that lactation was fully established. During lactation, body weight was controlled weekly and some pups from each litter were sacrificed at PND21, generating the experimental groups NL-PND21 (n=7) and SL-PND21 (n=7). The rest of the male pups were divided in two groups that were exposed to SE, which consisted of standard collective cages of 3 or 4 animals without objects; or EE, which consisted of collective cages of 10 to 14 animals along with inanimate objects of different textures, shapes, and colors. Body weight and food intake were controlled weekly, and behavioral tests were performed. In PND90 the animals were sacrificed to generate the experimental groups NL-SE 90 (n=14), SL-SE 90 (n=13), NL-EE 90 (n=14), and SL-EE 90 (n= 13). Stem blood was taken, the brain was extracted and frozen, and the epididymal adipose tissue (EAT) was dissected and weighed. Arcuate nucleus (ARC), ventral tegmental area (VTA), Nucleus Accumbens Core (NAcC), and Shell (NAcSh) were isolated from frozen brain sections using a cryostat and Palkovits micro-punch technique. From this tissue, nucleic acids were extracted using TRIzol, gene expression was measured using RT-qPCR, and DNA methylation levels were measured using the MSRM-qPCR technique. SL-PND21 animals presented obesity, greater EAT, and characteristic features of metabolic syndrome at weaning. These animals also presented an anorexigenic signal that tried to regulate the energy balance through the leptin/Ob-Rb/POMC system with epigenetic mechanisms of regulation on the *Pomc* promoter. However, there was a very potent orexigenic signal mediated by the ghrelin/GHSR/NPY system that maintained the positive energy balance. SL-DPN21 animals also presented higher expression of tyrosine hydroxylase and reduced expression of the active dopamine transporter (DAT) in VTA which would increase inter-synaptic dopamine (DA) levels. In response to this, the DA receptor 2 (DRD2), which regulates DA synthesis, was upregulated in the same area and DAT, which clears DA from the synaptic space, was upregulated in NAcC. Associated to this, SL-PND21 animals presented normal behavior in the tests. These alterations were temporary since SL-SE 90 animals presented normal body weight, intake, and serum metabolites. Only EAT weight remained a little increased. These animals presented a decreased orexigenic signal, normal GHSR expression and epigenetic regulation mechanisms in the *Pomc* promoter, which justifies the normalization of body weight. On the other hand, SL-SE 90 animals presented lower expression of the DA receptor 1 (DRD1) and higher expression of DAT in NAcSh. These alterations may be related to the greater preference for sucrose intake shown by SL-SE 90 animals in the specific sensory satiety test. NL-EE 90 animals presented lower body weight and EAT accompanied by reduced intake. They also presented an increased anorexigenic signal due to an increase in proopiomelanocortin neuropeptide, Ob-Rb and

IR hormone receptors in ARC. NL-EE 90 animals also presented increased hormone receptors in VTA that could reduce the activation of dopaminergic neurons and food intake. Furthermore, these animals presented a reduction of DRD1 and DRD2 in NAc that could generate a lower reward sensitivity. SL-EE 90 animals reduced their body weight and EAT equaling the NL-SE 90 group. In addition, there was a reduction in food intake related to an increased anorexigenic signal in the homeostatic control of intake. SL-EE 90 animals regularized the alterations of the SL-SE 90 group in NAcSh and normalized the behavior towards food. This work demonstrates that reduced litter generates negative effects at metabolic levels and in systems that control food intake in the short and long term. However, EE reversed these effects in adulthood. Furthermore, the vulnerability of a critical period of development, such as lactation, is demonstrated, and evidence is provided of the effects that nutrition and the neonatal environment can have on health in the short and long term.

3- Introducción

Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, que se da como consecuencia de un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas (World Health Organization, 2021). Este mecanismo servía en la antigüedad como un elemento adaptativo en las condiciones de escasez de comida. Sin embargo, en la actualidad, el aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico, y un descenso en la actividad física debido al sedentarismo diario ha promovido el aumento de peso corporal (Fulton, 2010). Esto también ha llevado a un aumento generalizado de enfermedades relacionadas con la obesidad y el sobrepeso, como la hiperlipidemia, diabetes, hipertensión, enfermedades coronarias y una mayor incidencia de ciertas formas de cáncer, complicaciones respiratorias e irregularidades reproductivas (Breier et al., 2001). Según datos de la World Health Organization (2021), desde 1975, la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo y en 2016, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas. Solo en Argentina, el exceso de peso aumentó de 49% en 2005 a 66% en 2018 (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC) - Secretaría de Gobierno de Salud de Argentina., 2019). Esta problemática es cada vez más común en etapas tempranas de la vida. A nivel mundial, la presencia de sobrepeso u obesidad en niños y adolescentes aumentó de forma exagerada, del 4% en 1975 a 18% en 2016. Este aumento fue similar en ambos sexos: un 18% de niñas y un 19% de niños. De esta manera, en 2016 había 41 millones de niños menores de cinco años y más de 340 millones de niños y adolescentes (5 a 19 años) con sobrepeso u obesidad. La obesidad infantil en particular se asocia con enfermedad del hígado graso, apnea del sueño, asma, esteatosis hepática, colesterol alto, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, afecciones de la piel, anomalías menstruales, deterioro del equilibrio y problemas ortopédicos. Aunque la mayoría de las condiciones de salud física asociadas con la obesidad infantil se pueden prevenir y pueden desaparecer cuando un niño o adolescente alcanza un peso saludable, algunas continúan teniendo consecuencias negativas durante la edad adulta. Además de estar implicada en numerosos problemas físicos, la obesidad infantil afecta la salud social y emocional de niños y adolescentes. Los niños con sobrepeso y obesidad a menudo son objeto de burlas y/o acoso por su peso. Quedan excluidos de las actividades, en particular las actividades competitivas que requieren actividad física. Estos problemas sociales negativos contribuyen a una baja autoestima, poca confianza en sí mismos y una imagen corporal negativa, que también pueden afectar el rendimiento académico. Este es un sistema que se retroalimenta ya que, las

consecuencias sociales de la obesidad pueden contribuir a que continúe la dificultad para controlar el peso. Los niños con sobrepeso tienden a protegerse de los comentarios y actitudes negativas retirándose a lugares seguros, como sus hogares, donde pueden buscar comida como consuelo. Estos niños tienden a tener menos amigos, lo que resulta en menos interacción social y juego, y más tiempo dedicado a actividades sedentarias (World Health Organization, 2018). La influencia de la genética en la adiposidad puede ser a través de la afección a un gen que afecta varios objetivos fisiológicos importantes para la regulación del peso corporal (Willer et al., 2009). Sin embargo, en casos muy raro se da la obesidad solo por una afección genética. Es posible que el sobrepeso y la obesidad sean la consecuencia de una susceptibilidad genética que aumenta el riesgo de obesidad bajo un conjunto determinado de condiciones dependientes del estilo de vida (Vucetic & Reyes, 2010). Investigadores de todo el mundo han centrado su atención en los primeros 1000 días de vida, que es la fase más importante para el desarrollo físico y mental del ser humano: el período que va desde los 9 meses de gestación hasta los 2 años de edad. Durante este período, se produce la mayor cantidad de crecimiento humano porque cada célula del cuerpo se está formando y programando (Agosti et al., 2017; Fleming et al., 2018). De hecho, estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han demostrado que las agresiones que ocurren en las ventanas críticas del embarazo y la lactancia aumentan el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) a lo largo de la vida, como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Entre las agresiones se encuentran factores nutricionales, como la desnutrición; factores hormonales, como el estrés; y factores ambientales, como la exposición a contaminantes. Este fenómeno se denominó programación metabólica, plasticidad del desarrollo y, más recientemente, concepto de orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD). Los mecanismos implicados en este fenómeno están siendo investigados y los cambios epigenéticos parecen jugar un papel clave en el inicio de este proceso (Lisboa et al., 2021).

Modelo de camada reducida

En roedores, el período de lactancia es un periodo crítico muy importante durante el desarrollo (Bouret et al., 2004; Ellsworth et al., 2018; Ong et al., 2012). En roedores, el sistema nervioso no madura completamente hasta la tercera semana de vida (Ong et al., 2012). Las proyecciones de ARC son bastante inmaduras al nacer y llegan a la madurez cerca del día postnatal 10 (Bouret et al., 2004). Por su parte, la inervación de neuronas dopaminérgicas y la expresión del receptor de DA están presentes temprano en el desarrollo, pero maduran durante la adolescencia y forman patrones estables en la adultez temprana (Money & Stanwood, 2013). Esta línea de tiempo de desarrollo

prolongada proporciona una gran ventana de "períodos críticos" durante los cuales los disruptores potenciales pueden inducir efectos variados. Por lo tanto, es posible que la exposición excesiva a los alimentos durante la vida temprana produzca cambios a largo plazo en el sistema de regulación de la ingesta (Ong & Muhlhausler, 2011; Vucetic & Reyes, 2010). Un modelo animal establecido para el estudio de los efectos de la sobrealimentación neonatal es criar los animales en camadas pequeñas (SL por sus siglas en inglés) (Možeš et al., 2014; Plagemann et al., 2012; Portella et al., 2015). Este modelo consiste en reducir el número de crías en la camada en un día determinado de la lactancia. El número de crías incluidos en los grupos control y camada reducida difiere enormemente según el estudio. El tamaño de la camada se reduce a 2, 3 o 4 crías por madre, mientras que el grupo control varía entre 6 y 12 crías durante la lactancia. Por otro lado, también se ha visto que los estudios difieren en el día de reducción de camada entre DPN1 y 4. Sin embargo, a pesar de las diferencias entre laboratorios, la alta variabilidad en el diseño experimental y la gran variedad de especies y cepas que se utilizan, los resultados fenotípicos son bastante similares en todos los estudios encontrados en la bibliografía (Parra-Vargas et al., 2020). Este modelo logra generar una menor competencia por el tiempo con la madre y, por lo tanto, mayor consumo de leche y ganancia de peso durante el periodo postnatal temprano (Fiorotto et al., 1991). La sobrealimentación contribuye, al menos en parte, a la alteración del fenotipo metabólico y la programación temprana del circuito cerebral, que puede durar hasta la edad adulta (Habbout et al., 2013; Plagemann et al., 2012; Portella et al., 2015; Spencer & Jenkins, 2016; Vucetic & Reyes, 2010). También se ha reportado que la sobrealimentación en edades tempranas es un factor de riesgo epigenético en la programación de la obesidad (Plagemann et al., 2009). Sin embargo, aún no se conocen completamente todos los mecanismos moleculares de esta "programación o DOHaD".

Entorno Ambiental y estilo de vida

Se piensa más comúnmente que un conjunto de factores ambientales y su influencia en la composición genética contribuyen a la tendencia al aumento de la obesidad (Nicolaidis, 2019; Vucetic & Reyes, 2010). A diario, tanto adultos como niños se enfrentan con muchas opciones sobre cómo distribuir su tiempo y actividades haciendo cosas que nos hagan sentir bien. La alimentación es a menudo una opción entre otras muchas actividades, y la elección de alimentos ricos en grasas y azúcares que nos generen placer es muy común. Estudios previos han demostrado que los niños delgados encuentran más placenteras alternativas "no alimentarias" tales como juguetes y entretenimientos que el consumo de alimentos, mientras que los niños con sobrepeso/obesidad muestran la preferencia opuesta. Esta observación podría implicar

que el entorno de los niños delgados puede tener un efecto protector contra la obesidad (Kong et al., 2015). En este sentido, en modelos animales se ha aplicado el concepto de ambiente enriquecido (EE), que, en un entorno experimental, se refiere a "enriquecer" las condiciones estándar de alojamiento del laboratorio (van Praag et al., 2000). Esto consiste en "una combinación compleja de estimulación inanimada y social", que genera el aumento de las interacciones sociales dinámicas, la exposición frecuente a objetos novedosos y, en algunos casos, una mayor actividad física (Cao et al., 2011). Existe una gran diversidad de modelos de EE que combina estos estímulos de diferentes maneras, lo cual hace difícil la comparación entre diferentes estudios. Se ha visto que la relevancia de los factores contribuyentes únicos no se puede aislar fácilmente, pero hay buenas razones para suponer que la interacción de los factores es el elemento esencial de un entorno enriquecido, y no un elemento individual que esté oculto en la complejidad (van Praag et al., 2000). En general, los animales "enriquecidos" se mantienen en jaulas más grandes y en grupos más grandes donde se agregan objetos de diferentes tamaños, colores y texturas que pueden variar durante el período del experimento (Figura 1).

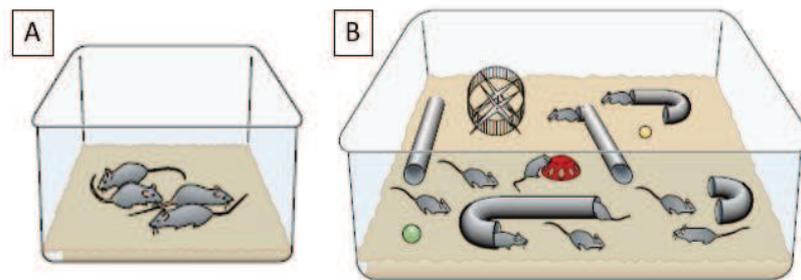


Figura 1. Diferentes tipos de entornos ambientales. A: ambiente estándar (SE). B: ambiente enriquecido (EE). Modificado de van Praag et al., 2000.

Se ha visto en modelos animales que el EE con estimulación cognitiva y social compleja previene enfermedades mejorando, entre otras cosas, el desarrollo cognitivo y el estado metabólico (Cao et al., 2011; Rossetti et al., 2015; Young et al., 1999). Estos estudios reportaron que el EE redujo el peso corporal y el tejido adiposo, tuvo efectos positivos sobre el comportamiento hacia los alimentos y la sensibilidad a la leptina e insulina. Además, todos estos cambios estuvieron relacionados con alteraciones en los circuitos cerebrales involucrados en el balance energético corporal (Cao et al., 2011; Mainardi et al., 2010). Estos estudios demuestran que el EE juega un rol importante en el metabolismo y el desarrollo de obesidad. Por lo tanto, es importante encontrar la relación entre los mecanismos cerebrales ya conocidos que regulan la ingesta y el entorno ambiental en el cual se desarrolla el individuo. Esto podría tener aplicaciones médicas directas con el EE como un agente protector de la obesidad.

Regulación del balance energético y el peso corporal

El sistema nervioso central (SNC) es capaz de detectar el estado metabólico y coordinar las respuestas apropiadas para mantener estables las reservas de grasa corporal a lo largo del tiempo (Vucetic & Reyes, 2010). Para esto, el SNC integra información de reservas de energía a largo plazo (por ejemplo, leptina) y señales relacionadas con las comidas a corto plazo (nutrientes y señales de saciedad derivadas del intestino) para regular la ingesta de alimentos y el gasto de energía (Figura 2) (Barsh & Schwartz, 2002). El balance energético positivo inducido por la sobrealimentación inhibe las propiedades gratificantes de los alimentos mientras aumenta la saciedad inducida por la comida, reduciendo así la ingesta de alimentos. En cambio, durante la privación de energía, se activan respuestas adaptativas del SNC que aumentan las propiedades gratificantes de los alimentos y reducen la respuesta a las señales de saciedad, lo que resulta en aumento del consumo de alimentos. Para esto, el cerebro tiene dos sistemas claves que están regulados dinámicamente para controlar la ingesta y el gasto energético: el control homeostático y el control no homeostático o hedónico. El control homeostático es necesario para los procesos metabólicos básicos y la supervivencia, mientras que el control hedónico está impulsado por el placer y los aspectos emocionales de la alimentación.

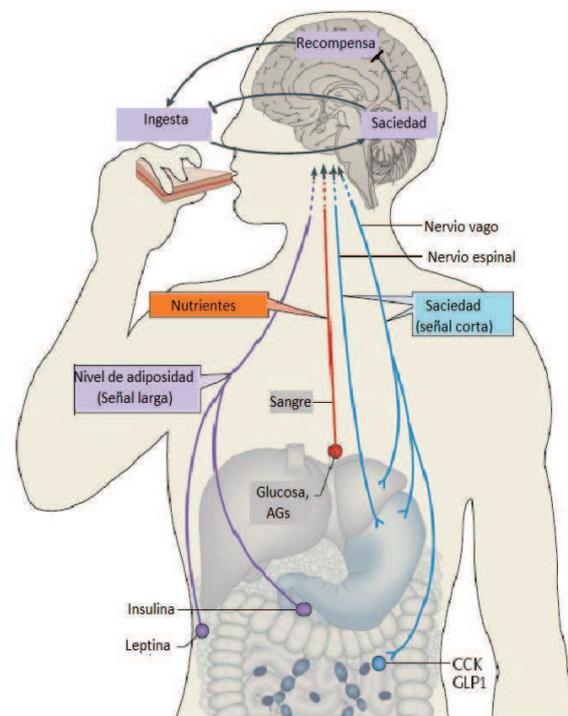


Figura 2. El sistema nervioso central integra la información periférica para regular la ingesta de alimentos y el gasto energético. CCK: colecistoquinina; AGs: ácidos grasos; GLP1: péptido similar al glucagón 1. Modificado de Morton et al., 2014.

Control homeostático de la ingesta

El control homeostático es llevado a cabo por un área del cerebro denominada hipotálamo. Éste regula el balance de energía mediante el aumento de la motivación por comer tras el agotamiento de las reservas de energía. El rol de las distintas regiones del hipotálamo es de vital importancia (Figura 2): los núcleos arcuato (ARC), ventromediano (VMN) y paraventricular (PVN), así como el hipotálamo lateral (LHA) son las principales áreas implicadas en el control de la ingesta. En particular, el ARC es la primera área involucrada en el control de la homeostasis energética ya que es el que recibe las señales periféricas y es donde se desencadenan las primeras acciones de control. Está ubicado en la base del hipotálamo, adyacente a la eminencia media (ME) y el tercer ventrículo (3V), estratégicamente posicionado para detectar fluctuaciones hormonales y de nutrientes en el torrente sanguíneo (Barsh & Schwartz, 2002; Williams et al., 2001).

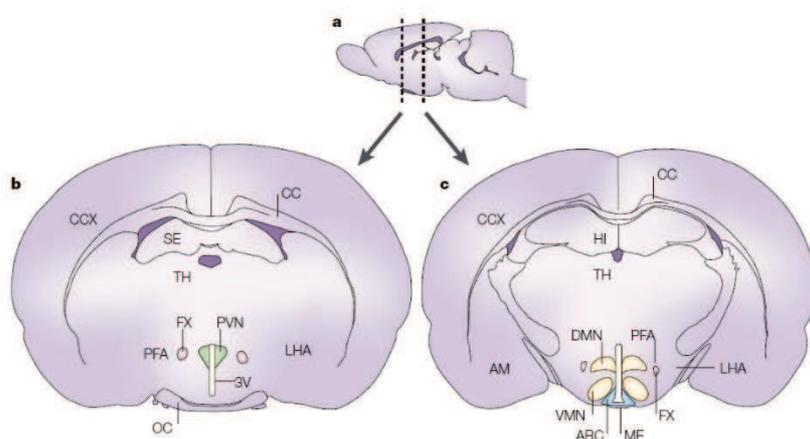


Figura 3. Principales regiones hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos en el cerebro de una ratona. a: Vista longitudinal del cerebro de una ratona. b, c: Secciones transversales del cerebro (indicado por líneas discontinuas en a) donde se ven las diferentes áreas del hipotálamo: Núcleo Arcuato (ARC, que se muestra en turquesa); Núcleo Paraventricular (PVN); Núcleo Ventromedial (VMN); Núcleo Dorsomedial (DMN) y Área Hipotalámica Lateral (LHA). Se muestran también otras áreas cerebrales como, Área perifornical (PFA), Fórnix (FX), OC: Quiasma óptico, 3V: tercer ventrículo y ME: eminencia media, entre otras. Modificado de Barsh & Schwartz, 2002.

El ARC actúa como sensor del estado energético de todo el cuerpo e inician respuestas aguas arriba para regular las reservas corporales. Para esto, tiene dos poblaciones principales de neuronas que actúan para controlar el apetito y el gasto de energía (Figura 4): un conjunto de neuronas que co-expresan los neuropéptidos orexigénicos, el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agutí (AgRP), que estimulan la ingesta de alimentos y disminuyen el gasto de energía; y otra población de neuronas que co-expresan los neuropéptidos anorexigénicos, transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART) y proopiomelanocortina (POMC), que inhiben la ingesta de alimentos y aumentan el gasto de energía (Barsh & Schwartz, 2002). Estas neuronas responden a las señales periféricas por medio de los receptores de muchas moléculas circulantes asociadas con la regulación de la ingesta, incluidas la leptina, insulina y la

grelina (Rossi & Stuber, 2018). La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo que circula a niveles proporcionales al contenido de grasa corporal (Barsh & Schwartz, 2002). Esta hormona tiene un potente efecto anorexigénico mediado por la isoforma larga de su receptor (Ob-Rb), la única isoforma específica que contiene todos los motivos intracelulares necesarios para la activación completa de las vías de señalización (Pan et al., 2014). En ARC, la leptina aumenta la actividad de las neuronas POMC/CART anorexigénicas y, por el contrario, inhibe las neuronas NPY/AgRP orexigénicas (Bell et al., 2018). Este mecanismo muchas veces se altera en los individuos obesos, lo que resulta en un estado conocido como resistencia central a la leptina (Andreoli et al., 2015). La insulina es una hormona liberada por las células beta del páncreas que regula la homeostasis de la glucosa. También es un indicador periférico del estado energético que se une a su receptor específico (IR) en las neuronas del ARC para coordinar el comportamiento alimentario, la adiposidad corporal, el gasto de energía, la sensibilidad periférica a la insulina y la homeostasis de la glucosa. Todo esto lo hace, de manera similar a la leptina, por medio de la activación de las neuronas POMC e inhibición de las neuronas AgRP, logrando reprimir la alimentación y aumentar el gasto de energía (Dodd & Tiganis, 2017). Por otro lado, la grelina es una hormona que se sintetiza y almacena principalmente en el estómago y tiene un potente efecto orexigénico en el cerebro que está mediado por el receptor del Secretagogo de la Hormona del Crecimiento (GHSR). La activación de neuronas AgRP/NPY por este receptor estimula la ingesta de alimentos (Cabral et al., 2014). Estas vías proporcionan un mecanismo molecular para integrar señales de equilibrio energético a largo plazo (ej. Leptina e Insulina) con señales de patrones de ingesta a corto plazo (ej. Grelina).

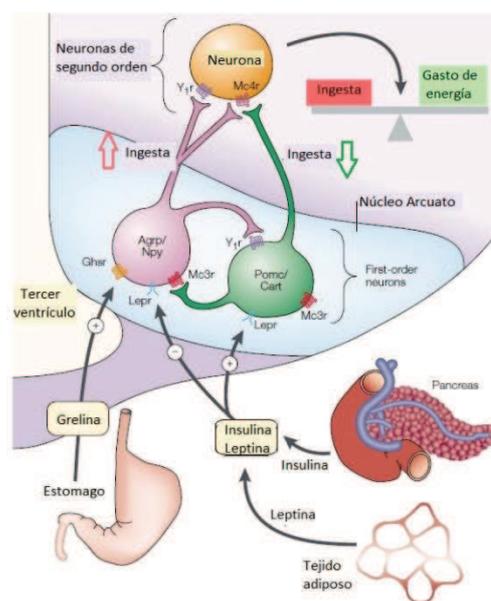


Figura 4. Control de la homeostasis energética por neuronas del Núcleo Arcuato. Pomc/Cart: neurona anorexigénica; Agrp/Npy: neurona orexigénica; Ghsr: receptor de grelina; Lepr: receptor de leptina; Mc3r/Mc4r: receptor de melanocortina 3/4; Y1r: receptor del neuropéptido Y1. Modificado de Barsh & Schwartz, 2002.

Control Hedónico de la ingesta

El control hedónico de la ingesta se produce principalmente a través del sistema de recompensa del SNC (Erlanson-Albertsson, 2005). Los alimentos con alto contenido de grasa y azúcar son naturalmente gratificantes, brindan nutrientes y energía, así como también placer y gratificación. El sistema de recompensa puede promover la ingesta de este tipo de alimentos incluso cuando se han satisfecho los requisitos energéticos, lo que contribuye a la ingesta excesiva y el consecuente aumento de peso. Además, desencadena asociaciones de aprendizaje entre el estímulo y la recompensa (condicionamiento) que nos ayuda a identificar los alimentos gratificantes y refuerza el comportamiento futuro dirigido a obtener estos alimentos (Alonso-Alonso et al., 2015; Fulton, 2010; Volkow et al., 2011). En términos evolutivos, esta propiedad de los alimentos altos en grasas y azúcares solía ser ventajosa porque aseguraba que se comieran alimentos con alta carga energética cuando hubiera disponibilidad. Esto permitía almacenar energía en el cuerpo en forma de grasa para necesidades futuras en entornos donde las fuentes de alimentos eran escasas. Sin embargo, en las sociedades modernas, donde los alimentos están ampliamente disponibles, esta adaptación se ha convertido en una característica negativa (Volkow et al., 2011). El sistema neuronal que interviene en el sistema de recompensa consiste en una red de circuitos y regiones cerebrales muy compleja. Varias regiones límbicas [núcleo accumbens (NAc), amígdala e hipocampo] y regiones cerebrales corticales [corteza orbitofrontal, giro cingulado e ínsula] y sistemas de neurotransmisores (dopamina, serotonina, opioides y cannabinoides), así como el hipotálamo están implicados en los efectos gratificantes de los alimentos (Volkow et al., 2011). En este sistema, los circuitos del neurotransmisor dopamina (DA) han sido los más estudiados y mejor caracterizados. Se ha visto que la DA es necesaria para el desarrollo de la motivación y la recompensa, y, por lo tanto, desempeña un papel fundamental en el comportamiento alimentario (Novelle & Diéguez, 2018; Palmiter, 2007). Las vías neurales centrales asociadas con la señalización dopaminérgica son complejas, pero los circuitos más estudiados son (Figura 5): el circuito nigroestriatal, que se asocia principalmente con el control motor, muy vinculado con enfermedades de múltiples trastornos del movimiento, como el Parkinson y la enfermedad de Huntington; el circuito mesolímbico, esenciales para la recompensa; y el circuito mesocortical, involucrado en los comportamientos motivacionales (Vucetic & Reyes, 2010).

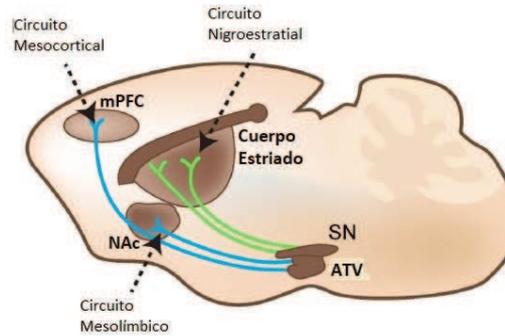


Figura 5. Circuitos dopaminérgicos nigroestriatal, mesocortical y mesolímbico en el cerebro de un roedor adulto en el plano sagital. SN: sustancia negra; ATV: área tegmental ventral; NAc: núcleo accumbens; mPFC: corteza prefrontal media. Modificado de Money & Stanwood, 2013.

El circuito dopaminérgico mesolímbico comienza en las neuronas DA del Área Tegmental Ventral (ATV) que se proyectan hacia el NAc (Fulton, 2010; Lammel et al., 2008; Vucetic & Reyes, 2010). La DA se sintetiza en el soma de las neuronas del ATV a partir de la L-tirosina por la acción de la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante de su biosíntesis (Meye & Adan, 2014). Se han identificado cinco variantes de receptores DA, pero DRD1 y DRD2 son los que se expresan más abundantemente en el cerebro (Baik, 2013; De Jong et al., 2015). DRD2 puede actuar como un autoreceptor somatodendrítico, modulando la neurotransmisión de DA e inhibiendo la liberación de DA dependiente de impulsos (Bello et al., 2011; De Jong et al., 2015). La terminación de la señalización DA ocurre en el espacio sináptico a través de la recaptación a través del transportador activo de dopamina (DAT) (Maggos et al., 1997; Vucetic & Reyes, 2010). Por lo tanto, hay dos mecanismos que controlan la neurotransmisión de DA: la captación de DA a través de DAT y la inhibición de la liberación a través del autoreceptor pre-sináptico DRD2 (Cragg & Greenfield, 1997). Además, las neuronas DA en ATV expresan receptores para hormonas circulantes que, como reguladores de la homeostasis energética, pueden actuar modulando la función dopaminérgica (Finglewicz & Sipols, 2010; Mebel et al., 2012; Pan et al., 2014; Perelló & Zigman, 2012; Rossi & Stuber, 2018). Específicamente, la insulina y la leptina pueden disminuir los comportamientos de recompensa alimentaria y modular la función de los sistemas de neurotransmisores y los circuitos neuronales que median la recompensa alimentaria (Fulton et al., 2006; Hommel et al., 2006). La grelina puede aumentar los comportamientos de búsqueda de recompensa de alimentos y apoyar la función neuronal DA en los núcleos receptores (Abizaid et al., 2006; Naleid et al., 2005).

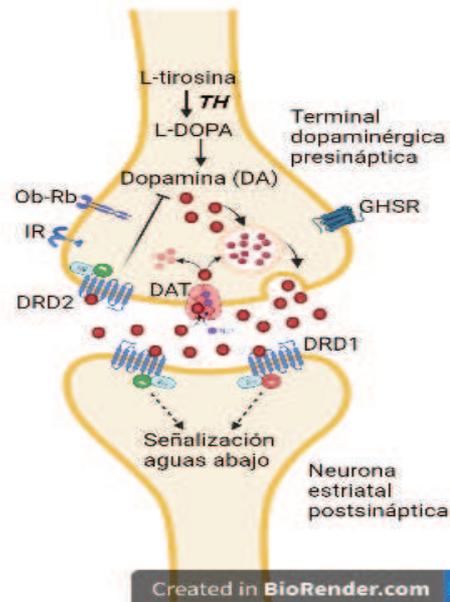


Figura 6. Esquema que ilustra la síntesis y transmisión de dopamina de las terminales pre-sinápticas en las neuronas del cuerpo estriado. TH: Tirosina hidroxilasa. DA: Dopamina. Ob-Rb: Receptor de leptina. IR: Receptor de insulina. GHSR: Receptor de grelina. DRD1/2: Receptor de dopamina 1 y 2. DAT: Transportador activo de la dopamina. Adaptado de Ford, 2014.

El NAc es un núcleo del estriado ventral que es una estructura heterogénea que se subdivide en dos compartimentos en función de su conectividad y respuestas relacionadas con la recompensa, una capa o shell medioventral (NAcSh) y un núcleo o core laterodorsal (NAcC) (Anderson & Hearing, 2019; Gonzales et al., 2004). El consumo de alimentos sabrosos estimula la transmisión dopaminérgica preferentemente en NAcSh en comparación con NAcC (Fulton, 2010). Por otro lado, las proyecciones dopaminérgicas a NAcC brindan un valor de motivación genérico asociado a una posible recompensa que permite traducirlo en acciones concretas, lo que conduce al desarrollo de comportamientos motivados (Bassareo et al., 2002). Sin embargo, el entendimiento de cuál es la contribución de cada compartimento a la regulación de la alimentación sigue siendo investigado. Más allá de esto, el papel de NAc en la regulación del apetito mediada por el circuito dopaminérgico mesolímbico ha sido ampliamente estudiado (Vucetic & Reyes, 2010). Este núcleo presenta neuronas que expresan uno o ambos receptores de DA (DRD1/2). Por medio de estos receptores se da la señalización de DA y activación de neuronas del NAc para desencadenar las respuestas comportamentales tanto a estímulos naturales como a las drogas de abuso (Anderson & Hearing, 2019). La liberación de DA en NAc tiene un impacto destacado en los comportamientos de incentivo apetitivo relacionados con los aspectos hedónicos de la comida (alimentación por placer). Es decir, el aumento de la señalización de DA motivará a un animal a participar en comportamientos para lograr objetivos específicos, como comer alimentos palatable porque quieren la recompensa y trabajarán más duro

para obtenerla. Este comportamiento atribuye importancia motivacional al estímulo gratificante y aprendizaje condicionado de asociación estímulo-recompensa y predicción de recompensa (Vucetic & Reyes, 2010). El comportamiento es un componente esencial de la ecuación del balance de energía. Los comportamientos apetitivos y consumatorios son los únicos medios a través de los cuales se logra la ingesta de energía, y todo comportamiento implica un gasto de energía. Las propiedades gratificantes de los alimentos pueden influir drásticamente en la propensión a participar o continuar con el comportamiento de alimentación (Fulton, 2010). El consumo excesivo de alimentos puede generar características conductuales particulares como la falta de control sobre el inicio y la finalización del consumo de alimentos, comportamiento compulsivo y adaptación/sensibilización a estímulos gratificantes (Vucetic & Reyes, 2010). La conducta hacia los alimentos se puede evaluar por medio de test conductuales que miden las respuestas conductuales adquiridas y voluntarias que están dirigidas a obtener el alimento (Fulton, 2010).

Regulación epigenética de la expresión génica

Hay varios mecanismos posibles que podrían causar alteraciones en los circuitos cerebrales que controlan la ingesta de alimentos, incluidas las modificaciones epigenéticas que dan lugar a una expresión génica alterada de las moléculas involucradas (Marco et al., 2012). La epigenética es el sistema de regulación biológica a través del cual los organismos responden a cambios ambientales. Estas modificaciones actúan generando cambios en la expresión génica sin alterar las secuencias de ADN. La maquinaria epigenética implica varios niveles de regulación, incluyendo la metilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de histonas y ARNs no codificante (Roth, 2013). Particularmente, la metilación del ADN tiene un papel crítico en la regulación de la transcripción génica y como mecanismo de la memoria celular para cambiar en respuesta al entorno ambiental (Attwood et al., 2002; Bommarito & Fry, 2018; Zhai et al., 2018). Este proceso, catalizado por la enzima ADN metiltransferasa, se da por el agregado covalentemente de un grupo metilo a la posición C5 de la citosina, creando la base modificada 5-metilcitosina. La metilación ocurre principalmente en una citosina próxima a una base de guanina, también conocida como dinucleótidos CpG. Este dinucleótido es un palíndromo, con ambas hebras de ADN leyendo la misma secuencia en la dirección 5' a 3', por lo tanto, la metilación de los dinucleótidos CpG se mantiene después de la división celular. Existen regiones enriquecidas en GC, conocidas como islas CpG, que se encuentran dispersas por todo el genoma, incluyendo las regiones promotoras de la transcripción de los genes. El

mecanismo propuesto para explicar cómo la metilación del ADN regula la expresión génica es que la metilación de CpG bloquea los factores de transcripción para que no se unan a los promotores impidiendo el inicio de la expresión génica. Esta teoría proporciona una explicación de la relación inversa entre la expresión génica y la metilación del ADN (Forma Canónica) (Attwood et al., 2002; Bommarito & Fry, 2018). Este tipo de mecanismos epigenéticos se han visto como un componente clave en el control de la ingesta de alimentos y la homeostasis de la energía. Estudios recientes vinculan la "programación del desarrollo" de la obesidad y el trastorno metabólico con cambios en la metilación del ADN en el hipotálamo (Marousez et al., 2019). Varios genes involucrados en el control de la ingesta de alimentos están regulados a través de este mecanismo (Conceição et al., 2016; Lazzarino et al., 2017; Portella et al., 2015; Rossetti et al., 2019; Vucetic et al., 2012). Los neuropéptidos POMC y NPY, y el receptor de leptina son targets de regulación epigenética durante períodos críticos del desarrollo tanto embrionario como postnatal temprano (Li et al., 2014; Plagemann et al., 2009). Sin embargo, pocos datos se han reportado sobre los efectos de la sobrealimentación neonatal y el EE en la regulación epigenética de los genes involucrados en los sistemas de control de la ingesta.

4- Hipótesis

Por todo lo dicho anteriormente, proponemos que la exposición a EE mejora o incluso revierte las alteraciones inducidas por el exceso de nutrición temprana en un modelo de SL, a través de modificaciones en el delicado equilibrio de los sistemas homeostáticos y hedónicos que regulan la ingesta. Además, creemos que mecanismos epigenéticos de naturaleza no genómica están involucrados en estas neuroadaptaciones.

5- Objetivos del Trabajo

El objetivo general de este trabajo de tesis fue ampliar el conocimiento acerca del ambiente enriquecido (EE) y su influencia sobre áreas clave del cerebro que median el control de la ingesta. Particularmente planteamos estudiar si el EE previene o revierte las alteraciones generadas por el exceso de nutrición en la lactancia sobre la expresión de la red de genes relacionados a la obesidad. Sumado a esto, evaluamos las ventanas temporales en las que el EE ejerce sus acciones en forma predominante y el rol de los mecanismos epigenéticos en dichas alteraciones. Para ello propusimos un modelo experimental en que ratas machos fueron criadas en camadas pequeñas (SL) para generar obesidad en el periodo postnatal temprano. Los mecanismos homeostáticos que regulan la ingesta y los mecanismos hedónicos que implican al sistema de recompensa cerebral fueron el eje de nuestros interrogantes.

Objetivos específicos:

Objetivo 1. En ratas macho criadas en SL y sometidas a EE, estudiar:

- La progresión del peso corporal de los animales y su relación con los cambios en la ingesta, en la adiposidad y metabolitos como la glucosa.
- La expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos relacionados al control homeostático de la ingesta y de receptores hormonales involucrados en la regulación de la ingesta y el metabolismo, tales como receptor de insulina, leptina y grelina, en el principal núcleo hipotalámico, el ARC.
- La expresión de integrantes de la vía de señalización del sistema de recompensa mesolímbico relacionado al control no homeostático de la ingesta en el ATV y en el NAc core y NAc shell.
- Si estas alteraciones se relacionan con cambios en la conducta mediada por la dopamina hacia los alimentos, evaluada a través de test conductuales.

Objetivo 2. Analizar si el EE y SL inducen modificaciones epigenéticas de secuencias regulatorias de los principales genes involucrados en la regulación de la ingesta y cuyos niveles de expresión génica sean afectados por el tratamiento, tales como neuropéptidos, receptores de hormonas y transportadores y enzimas involucradas en el metabolismo de la dopamina.

Objetivo 3. Evaluar si el EE revierte los cambios inducidos por SL y ejerce sus efectos en una ventana temporal determinada. Para ello implementaremos el EE desde el destete, evaluando los parámetros arriba mencionados en la edad adulta.

6- Materiales y Métodos

Animales

Todos los procedimientos realizados con animales en este experimento fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y desarrollados de acuerdo con los principios y procesos delineados en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

Ratas Wistar hembras de 2 meses de edad fueron obtenidas del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina). Estos animales fueron alojados en jaulas comunitarias de 3 a 4 integrantes bajo condiciones normales de laboratorio ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y ciclo de luz-oscuridad de 12h) con acceso libre a agua y alimento balanceado (Cooperación, ACA Nutrición Animal, Buenos Aires, Argentina). Luego de 15 días de aclimatación, se realizó un seguimiento diario del ciclo estral de las hembras por medio de frotis vaginales para identificar el día en que estuvieran receptivas para el apareamiento. El procedimiento se realizó por extendido vaginal, introduciendo cuidadosamente una pipeta Pasteur con una punta fina conteniendo agua destilada (50 μL) en la vagina de la rata, se introdujo el agua y se extrajo el fluido vaginal. Estas muestras se colocaron en portaobjetos de vidrio y se observaron al microscopio. Para determinar el día de la fase del ciclo estral, se identificaron las características citológicas del extendido: estro: predominantemente células cornificadas; proestro: predominantemente células epiteliales nucleadas; diestro: predominantemente leucocitos; metaestro (también denominado diestro temprano): proporción igual entre leucocitos, células cornificadas y células nucleadas (Paccola et al., 2018). Los extendidos se realizaron por la mañana y las hembras que se encontraba en proestro fueron alojadas esa noche con un macho Wistar de fertilidad comprobada. Al día siguiente se confirmó la preñez por la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal. Las hembras preñadas fueron separadas y alojadas individualmente con agua y alimento balanceado a disposición hasta su parto.

Diseño experimental

El día del parto fue considerado como día postnatal (DPN) 0, las crías Wistar fueron sexadas en DPN1 y las camadas fueron reducida en el DPN4. La camada control o normal fue reducida a 10 crías por madre (NL, 7-8 machos más 2-3 hembras), mientras que la camada reducida fue reducida a 4 crías por madre (SL, 2-3 machos y 1-2

hembras). El DPN4 fue elegido como día de reducción de camada para asegurarnos que la lactancia se encontrara completamente establecida (Fiorotto et al., 1991). Solo camadas de 10 a 12 crías por madre fueron incluidas en este estudio, camadas de otro tamaño fueron descartadas para que ésta condición no afecte los resultados del experimento. Además, se dejó una mayoría de machos en las camadas debido a que se decidió utilizar solo las crías macho para este estudio con el fin de evitar los efectos de los cambios hormonales asociados al ciclo estral característico de la hembra. Durante la lactancia se controló el peso corporal semanalmente y al llegar al destete (DPN21), una o dos crías de cada camada fueron sacrificadas por decapitación, generando los grupos experimentales NL-DPN21 (n=7) y SL-DPN21 (n=7) [Experimento 1 – Figura 7]. El resto de las crías macho se dividió en dos grupos que fueron expuestos a diferentes ambientes hasta el DPN90: el ambiente estándar (SE) consistió en alojar los animales en jaulas colectivas estándares (350mm x 450mm x 200mm) de 3 o 4 animales sin objetos; el ambiente enriquecido (EE) consistió en alojar los animales en jaulas colectivas para EE (500mm x 800mm x 300mm) de 10 a 14 animales junto con objetos inanimados de diferentes texturas, formas y colores. Se controló el peso corporal y la ingesta de alimento balanceado semanalmente. Durante las últimas tres semanas del tratamiento se realizaron los test de conducta test de saciedad sensorial específica (test SSS), test de condicionamiento de preferencia de lugar (test CPP) y test de laberinto en cruz elevado (EPM), dejando siempre un periodo de descanso entre ellos. En DPN90 los animales fueron ayunados por 12h y luego sacrificados por decapitación para generar los grupos experimentales NL-SE 90 (n=14), SL-SE 90 (n=13), [Experimento 2 – Figura 7] y NL-EE 90 (n=14) y SL-EE 90 (n=13) [Experimento 3 – Figura 7]. Durante el sacrificio, se tomó la sangre troncal y se extrajo el cerebro del cráneo. La sangre fue calentada en estufa a 37°C por 30 min y luego fue centrifugada por 15 min a 3000 rpm a temperatura ambiente para obtener el suero, que fue guardado a -20°C hasta su utilización. Por otro lado, el cerebro fue congelado rápidamente colocando el lado ventral hacia arriba en un papel de aluminio esterilizado sobre hielo seco, una vez congelado, éste se almacenó a -80°C hasta su utilización. Algunos cerebros de cada grupo fueron designados para estudios de marcación proteica por inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia (IF). Para esto, los cerebros recién obtenidos fueron fijados por inmersión en paraformaldehído (Biopack) por 48h. Estos cerebros fijados fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol, luego aclarados por inmersión en Bioclear (Biopack) y finalmente fueron incluidos en tacos de parafina que se guardaron a temperatura ambiente hasta su procesado. Además, se diseccionó y pesó el tejido adiposo epididimal (TAE).

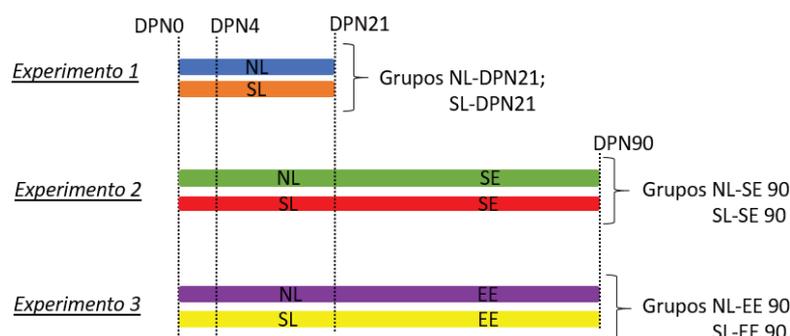


Figura 7: Diseño experimental. Diseño de los experimentos realizados en este trabajo con tiempos y tratamientos. NL: camada normal. SL: camada reducida. SE: ambiente normal. EE: ambiente enriquecido. DPN: día postnatal.

Determinación de los niveles de metabolitos en suero

A partir del suero obtenido de la sangre troncal extraída en la cirugía, se determinaron las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos en estas muestras utilizando kits comerciales según las instrucciones del fabricante (Wiener Co, Rosario, Argentina) por medio de un método espectrofotométrico (Boeco, Alemania). Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

Obtención de regiones individuales del cerebro y aislamiento de ácidos nucleicos

Los cerebros congelados fueron incluidos en OCT (Cryoplast-Biopack) y cortados en secciones coronales de 200µm para DPN21 o 300 µm para DPN90 utilizando un criostato (Leica Biosystems) a -18°C. Sobre estas secciones se diseccionaron las regiones ARC, ATV, NAcC y NAcSh mediante la técnica de microdisección de Palkovits (Palkovits, M. Brownstein, 1988) utilizando un micropunzón de acero inoxidable de 1,0mm. Para identificar estas regiones, se utilizó el Atlas del sistema nervioso de ratas en desarrollo (Paxinos et al., 1994), el Atlas del cerebro de rata postnatal en coordenadas estereotáxicas P21 (Khazipov et al., 2015) y El Cerebro de Rata (Paxinos & Watson, 2005). La topografía de los orificios generados con el micropunzón se inspeccionó bajo un microscopio (Zeiss, Oberkochen, Alemania) para determinar la reproducibilidad de las áreas microdisecionadas. Todas las regiones se aislaron bilateralmente y se almacenaron en 200uL de reactivo TRIzol (Invitrogen) a -80°C hasta su procesado. Cada región diseccionada del cerebro de cada animal se procesó y analizó como un único punto de datos. A partir de estos tejidos, se aislaron el ARN y el ADN totales siguiendo el protocolo del fabricante para extracciones de ácidos nucleicos con reactivo TRIzol. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se evaluaron midiendo la absorbancia a 260nm y la relación 260/280nm en un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.).

Finalmente, las muestras de ARN se almacenaron en agua de calidad Biología Molecular a -80°C y las muestras de ADN se almacenaron en buffer TE a -20°C hasta su posterior análisis.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

La transcripción reversa (RT) se realizó para obtener el ADNc del ARN. Esta reacción se llevó a cabo combinando 0,5µg de ARN total, 0,5µg de random hexamer primers (RHP, Biodynamics Argentina, Buenos Aires, Argentina), 20U de inhibidor de ribonucleasas (RNAout, Biodynamics Argentina, Buenos Aires, Argentina), 100nmol de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfato (dNTPs 25mM, Genbiotech) y 200U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, Biodynamics Argentina, Buenos Aires, Argentina) en un tubo de reacción con buffer 1X de la transcriptasa reversa y cantidad necesaria de agua de calidad Biología Molecular para un volumen final de 60 µL. La reacción se realizó utilizando el termociclador IVEMA con un programa adecuado para la reacción y el ADNc producido se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización. Para la amplificación y cuantificación de genes específicos se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRq) utilizando el termociclador StepOne real time (Applied Biosystems Inc., Life Technologies, CA, EE. UU.). La reacción se llevó a cabo combinando 2,5µl de ADNc con 2ul de HOTFIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Estonia), 0.25ul de cada primer específico del gen (Invitrogen, EE. UU.) y 5ul de agua de calidad Biología Molecular para completar un volumen final de 10µl. Los pares de primers específicos de los genes de interés utilizados para la amplificación fueron diseñados previamente en nuestro laboratorio (Lazzarino et al., 2017; Rossetti et al., 2019) y se detallan en la Tabla 1. La proteína ribosomal L19 se utilizó como gen de referencia porque es altamente estable y no cambia su expresión entre los grupos experimentales como se observó en estudios de nuestro y otros grupos (Andreoli et al., 2016; Dawoud Al-Bader & Ali Al-Sarraf, 2005). La pureza de las muestras amplificadas se confirmó mediante curvas de disociación con temperaturas de melting específicas y algunas de ellas fueron elegidas al azar para ser sometidas a electroforesis en gel de agarosa. En todos los ensayos, la amplificación de ADNc por PCRq se llevó a cabo por duplicado y se incluyeron controles negativos, que no produjeron amplificación. El ciclo umbral (Ct) y la eficiencia de PCRq se calcularon utilizando el software que provee el equipo Step One (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EE. UU.). La expresión de los genes estudiados sobre los valores del control se calculó para cada gen mediante el método de curva estándar relativa (Cikos, S., Bukovska, A. and Koppel, 2007). Este método consiste en normalizar la expresión relativa de cada gen estudiado con respecto a la cantidad relativa del gen de referencia

L19 y finalmente dividir este número por el valor normalizado de la muestra del grupo control. No se observaron diferencias significativas en los valores de Ct para L19 entre los grupos experimentales.

Tabla 1. Secuencia de primers usados en el estudio de la expresión de genes por PCRq.

Proteínas	Nombre del gene	Nº de acceso Genbank	Secuencia de primers	Tamaño (pb)
L19	<i>L19</i>	NM_031103.1	F: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' R: 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	99
POMC	<i>Pomc</i>	NM_139326.2	F: 5'-CCTCCTGCTTCAGACCTCCATA-3' R: 5'-TGTCATCTCCGTTGCCTGG-3'	159
CART	<i>Cart</i>	NM_017110.1	F: 5'-GCTCAAGAGTAAACGCATTCC-3' R: 5'-AAGAATTGCAAGAAGTTCCTCG-3'	143
AgRP	<i>Agrp</i>	NM_033650.1	F: 5'-TTGGCAGAGGTGCTAGATCCA-3' R: 5'-AGGACTCGTGCAGCCTTACAC-3'	108
NPY	<i>Npy</i>	NM_012614.1	F: 5'-CTTAATGAGAGAAAGCACAG-3' R: 5'-AACTAGGAAAAGTCAGGAGA-3'	101
Ob-Rb	<i>Ob-Rb</i>	NM_012596.1	F: 5'-AGGATGAGTGTGAGAGTCAA-3' R: 5'-CTCTTCATCAGTTTCCACTG-3'	80
IR	<i>InsR</i>	NM_017071.2	F: 5'-TCTCTCCAGGAACTACAGTGT-3' R: 5'-AAAATAGGTGGGTTCTGTCC-3'	80
GHSR	<i>Ghsr</i>	NM_032075.3	F: 5'-GCTCTGCAAACCTTTCCA-3' R: 5'-AAGCAGATGGCGAAGTAG-3'	99
TH	<i>Th</i>	NM_012740.3	F: 5'-TACCAAGATCAAACCTACCAGCC-3' R: 5'-GGTCAAACCTCACAGAGAATGGG-3'	118
DRD1	<i>Drd1</i>	NM_012546.3	F: 5'-TCCAAGGTGACCAACTTCTT-3' R: 5'-GTTACAAAAGGACCCAAAGG-3'	126
DRD2	<i>Drd2</i>	NM_012547.1	F: 5'-CCCAGCAGAAGGAGAAGAAA-3' R: 5'-CAGGATGTGCGTGATGAAGA-3'	95
DAT	<i>Slc6a3</i>	NM_012694.2	F: 5'-CATCACCACCTCCATTAECTCC-3' R: 5'-CATTGTGCTTCTGTGCCATG-3'	89

L19: Proteína ribosomal L19; POMC: Pro-opiomelanocortina; CART: Transcripto regulado por cocaína y amfetamina; AgRP: Proteína relacionada con agouti; NPY: Neuropeptido Y; Ob-Rb: receptor de leptina; IR: receptor de insulina; GHSR: receptor de grelina; TH: Tirosina hidroxilasa; DRD1: Receptor de dopamina 1; DRD2: Receptor de dopamina 2; DAT: Transportador activo de dopamina.

Análisis del estado de metilación del ADN

Este estudio se realizó por medio del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación (ERSM) y posterior análisis de PCRq. Esta metodología se basa en el hecho de que, si la región de ADN que se estudia está metilada, las ERSM no pueden cortar y el fragmento se amplifica mediante PCRq. Por el contrario, si la región no está metilada, las enzimas rompen el ADN y evitan la amplificación del fragmento. Por tanto,

el nivel de amplificaciones evidencia el porcentaje de metilación del ADN en la región de estudio. Para realizar estos estudios, el ADN aislado de las diferentes regiones del cerebro fue digerido usando las ERSM *Mae* II (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EE.UU.) y *Bst*U I (New England BioLab, Beverly, MA, EE.UU.). En detalle, se mezclaron 0,6µg de ADN con 1 unidad de *Mae* II o 10 unidades de *Bst*U I y buffer enzimático 1X durante 3 horas a 65°C o 1 hora a 60°C, respectivamente. Luego, los productos de digestión fueron purificados con el kit comercial de Wizard SV "Gel and PCR Clean-Up System" siguiendo el protocolo del fabricante (Promega, Madison, WI). Cada muestra se diluyó con agua de calidad BM hasta un volumen final de 25µL y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis. Luego, el grado relativo de metilación del promotor se estudió mediante PCRq y se determinó trazando los valores de Ct contra control interno (IC), lo que produjo curvas estándar para la cuantificación de muestras desconocidas y finalmente dividiendo por el valor normalizado de la muestra control (Cikos, S., Bukovska, A. and Koppel, 2007). El IC se diseñó en una región sin sitios de restricción para tener un control de la calidad del ADN. Por medio de este método, nosotros analizamos regiones de ADN que regulan la transcripción de los genes más importantes que presentaron alteraciones en la expresión del ARNm, es decir, *Pomc*, *Npy*, *Th*, *Drd2*, *Sc16a3* y *Drd1* (Figura 8). Por cuestiones metodológicas, este análisis fue para cada edad y ambiente de manera independiente. El análisis in silico de los sitios candidatos para el estudio de metilación del ADN (promotores, islas CpG, sitios de restricción para ERSM y posibles sitios de unión para factores de transcripción) fueron publicados previamente por nuestro grupo (Lazzarino et al., 2017; Rossetti et al., 2019). En particular para *Pomc*, estudiamos una región potenciadora del promotor denominada nPE1, en la cual se estudiaron los sitios *Mae* II (a) y *Bst*U I (b) (Figura 8 A). También se estudió otro sitio *Mae* II (c) ubicado cerca de la caja TATA y otro sitio *Bst*U I (d) situado corriente abajo del promotor (Figura 8 A). Con respecto a *Npy*, se estudiaron tres sitios *Bst*U I (a), (b) y (c) (Figura 8 B). Para *Th*, se estudiaron dos sitios *Mae* II (a) y (b) ubicados a lo largo del promotor (Figura 8 C). La región promotora de DRD2 no pudo analizarse debido a que la isla CpG, que ésta contiene, tiene una gran extensión y no logramos obtener resultados concluyentes por la técnica de PCRq (Figura 2 D). Con respecto a *Sc16a3*, se evaluaron dos sitios *Bst*U I (a) y (b) (Figura 8 E). En el promotor de *Drd1* estudiamos un sitio *Bst*U I (a) (Figura 8 F). Las secuencias de primers utilizadas para estudiar los diferentes sitios de restricción y el IC en cada gen se muestran en la Tabla 2. No se observaron diferencias significativas en los valores de Ct para los IC entre los grupos experimentales.

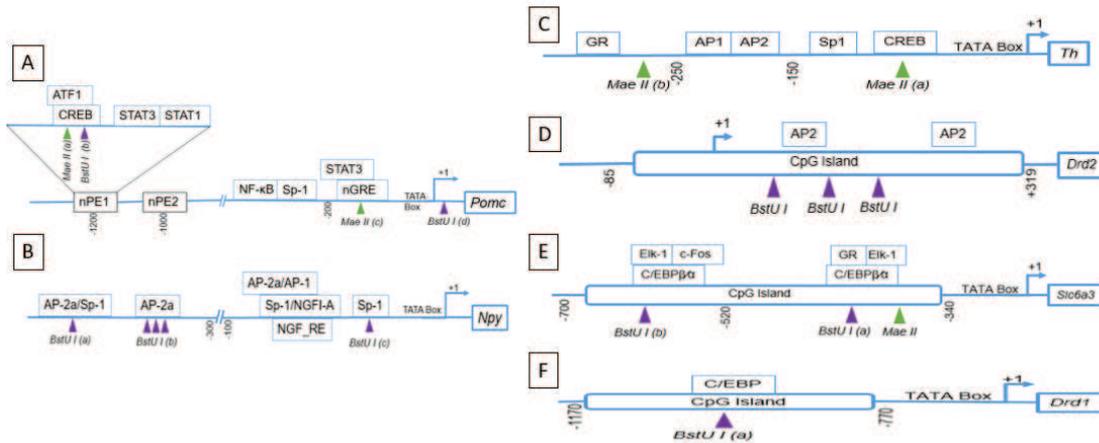


Figura 8. Esquema de las regiones promotoras estudiadas (regiones promotoras con islas CpG, sitios de restricción para enzimas sensibles a metilación y posibles sitios de unión a factores de transcripción). A: promotor y región potenciadora de *Pomc*. B: promotor de *Npy*. C: promotor de *Th*. D: promotor de *Drd2*. E: promotor de *Slc6a3*. Los triángulos violetas muestran los sitios de restricción de *BstU I* y los triángulos verdes muestran los sitios de restricción de *Mae II*.

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados en PCR cuantitativa en tiempo real para el análisis de metilación del ADN.

Región en estudio	Cebador directo	Cebador reverso
<i>Pomc</i> IC	5'-GGTGAAGGCTGTCAGACAATC-3'	5'-CCAAACTCCAAGGGAAAGG-3'
<i>Pomc</i> Mae II (c)	5'-CAGGAAGGTCACGTCCAAGG-3'	5'-CCGTTTGGTCCCTGTCACTC-3'
<i>Pomc</i> BstU I (d)	5'-GAGTGACAGGGACCAAACGG-3'	5'-CAGGAGCCGAGACACCCTTA-3'
nPE1 IC	5'-TAAGGGGCTAAAGGACCAAG-3'	5'-CTGCTCCACAACAGAACCAA-3'
nPE1 Mae II (a) / BstU I (b)	5'-TCAGACTGGTGACTGCTGGC-3'	5'-GGACTTCCTGGAGGTGCAGT-3'
<i>Npy</i> IC	5'-GTCCCTTGCTCAAAGTGGC-3'	5'-CATCGGTCAAACCTGGGTC-3'
<i>Npy</i> BstU I i (e)	5'-TTCCAGAGGCATTAAGTCAAGC-3'	5'-AAAAGACCAACGCCACTGTG-3'
<i>Npy</i> BstU I 3s (f)	5'-TCGCAGTTGTCCCAGAGATG-3'	5'-GGACCGCTTAGATTGCCTGT-3'
<i>Npy</i> BstU I f (g)	5'-GGAAGTGGCTGTGGGAGTCA-3'	5'-CTGCGAGGAATGAGCTCCAC-3'
<i>Th</i> IC	5'-CCATCAGATTTACCTAGAAGC-3'	5'-TGAGACTATGAAGGGACATTG-3'
<i>Th</i> Mae II (a)	5'-ACAGCAGGCGTGGAGAGGAT-3'	5'-TGGTGGTCCCGAGTTCTGTG-3'
<i>Th</i> Mae II (b)	5'-CCTTAGGAAATCCAGCATGG-3'	5'-ATTGCATCCACTGTCACAGG-3'
<i>DRD2</i> IC	5'-AATTCTGTGGTGCCTTCTCCT-3'	5'-ATGGGGTCAATCCAGAGTAGA-3'
<i>DRD2</i> BstU I	5'-AGTGCAGAGATAGTTCTGGG-3'	5'-AGAAGCCACAGACTGTCGTT-3'
<i>Slc6a3</i> IC	5'-TTTGGGGTCTCAACTAGAAA-3'	5'-TAAGACCTTTTCAGAACCCA-3'
<i>Slc6a3</i> BstU I (a)	5'-CTTCTGACAACCTCGCTGGA-3'	5'-GGGGCTTGACAGGAGTCTTT-3'
<i>Slc6a3</i> BstU I (b)	5'-CGTACAACACCGAAGGAAGA-3'	5'-CGAGGTTGTCAGAAGCAGAT-3'
<i>Drd1</i> IC	5'-GTGGTGAGAATCCCCTCAGG-3'	5'-AGTTCACAGGCGGAGAACC-3'
<i>Drd1</i> BstU I (a)	5'-AGCAGGAAACACAGGCACC-3'	5'-GCTTCTGCGGTCAACTCAGG-3'

Pomc: gen de la Proopiomelanocortina; nPE1: región potenciadora 1; *Npy*: gen del Neuropeptido Y. *Th*: gen de la Tirosina hidroxilasa; *Drd2*: gen del receptor 2 de dopamina; *Slc6a3*: gen del transportador activo de dopamina; *Drd1*: gen del receptor 1 de dopamina; IC: control interno.

Marcación de proteínas

La proteína POMC se marcó por inmunofluorescencia (IF) en la región del ARC (Bregma -2.5), mientras que las proteínas TH y DRD2 fueron marcadas por inmunohistoquímica (IHQ) en ATV (Bregma -5). Para esto, los cerebros de ratas incluidos en parafina fueron cortados en secciones coronales de 5µm utilizando un micrótomo (Leica Biosystems). Los bregmas de interés fueron identificados y recolectados con ayuda de las coordenadas de los atlas mencionados previamente. Posteriormente, los cortes fueron secados en estufa a 37°C ON, desparafinados con el reactivo Bioclear (Biopack, Buenos Aires, Argentina) realizando 3 pasajes de 5 min e hidratados realizando pasajes de 1 min en una serie graduada de etanol (100%, 96%, 70%). Luego, se realizó un pretratamiento con microondas para la recuperación antigénica de los cortes. Para la realización de la IHQ, el tejido se incubó con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. En cambio, para realizar la IF, el tejido se incubó con borohidruro de sodio que reduce la autofluorescencia. Además, las secciones se incubaron en una solución de leche descremada en polvo al 1,5 % (Sigma-Aldrich) disuelta en suero de caballo normal al 5 % para bloquear los sitios de unión a proteínas no específicas. El anticuerpo primario anti-POMC (anticuerpo policlonal hecho en rabbit de Phoenix Pharmaceuticals Inc.) se utilizó en una dilución de 1/1500, mientras que, el anticuerpo primario anti-TH (anticuerpo monoclonal hecho en ratón, Millipore) se usó en una dilución de 1/2000, ambos fueron incubados con los cortes ON a 4 °C. El anticuerpo primario anti-DRD2 (anticuerpo monoclonal hecho ratón, Santa Cruz Biotechnology) se usó en una dilución de 1/250 y se incubó con los cortes 48 h a 4 °C. Al día siguiente se realizó la incubación por 1 h con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón (LETH) en una dilución de 1/250 o el anticuerpo secundario fluorescente anti-conejo (Alexa 448 verde, Invitrogen) en una dilución de 1/250. El anticuerpo primario anti-DAT (anticuerpo monoclonal hecho en rata de Santa Cruz Biotechnology) fue probado con diferentes protocolos, pero no logramos obtener marcación específica en el tejido. Luego las reacciones de revelado para la IHQ se desarrollaron utilizando el método de estreptavidina-biotina peroxidasa o kit ABC más diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. Cada reacción incluyó controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario. Las imágenes de IHQ se obtuvieron con una videocámara a color SPOT (Diagnostic Instruments, Inc., Arnold, MD) conectada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical, Tokio, Japón). Las imágenes de IF se obtuvieron con una videocámara a color de alta resolución USB 2.0 (QImaging Go-3; QImaging, Surrey, British Columbia, Canada) asociada a un microscopio de fluorescencia Olympus BX-51 (Olympus). Las imágenes fueron posteriormente procesadas con Photoshop CS5 Extended.

Test Conductuales

- Test de conducta hacia los alimentos

Los animales fueron sometidos a diferentes test para evaluar la respuesta a desafíos con alimentos de sabor dulce.

-Test de saciedad sensorial específica (SSS, por sus siglas en inglés)

Esta prueba evalúa si el animal presenta "saciedad sensorial específica" al consumir alimentos. Este término hace referencia a un fenómeno hedónico sensorial relacionado con la disminución de la satisfacción que genera el consumo de alimentos y la consecuente renovación del apetito ante la exposición a un nuevo sabor. Esta prueba se realizó según el protocolo publicado por (Reichelt et al., 2014), utilizando una solución de sacarosa (S) al 10 % disuelta en agua del grifo (con colorante rosa) y una solución de maltodextrina (M) al 10 % disuelta en agua del grifo (con colorante azul). Estas soluciones tenían el mismo contenido energético (1680 kJ por 100 ml) y eran diferenciables. El protocolo constó de dos etapas (Figura 9): una etapa de familiarización donde los animales reconocieron las dos soluciones individualmente en exposiciones sucesivas durante dos días, y una etapa de pre-exposición y test, donde los animales fueron expuestos a una sola solución y luego a una elección de ambas soluciones en sesiones sucesivas durante dos días. El volumen consumido en cada sesión se registró por diferencia de peso de las botellas con solución antes y después de cada sesión. La prueba se realizó siempre entre las 9 y las 12 horas. Durante esos días, los animales se mantuvieron sin agua excepto durante un período de 2 h después del final de la prueba cada día entre las 13 y las 15 horas donde tuvieron libre acceso al agua.

Familiarización		Pre-exposición y Test	
S/M 20' -receso 1h- M/S 20' Día 1	M/S 20' -receso 1h- S/M 20' Día 2	S/M 20' -receso 2h- M y S 10' Día 3	M/S 20' -receso 2h- S y M 10' Día 4



Figura 9. Protocolo e imágenes del Test de saciedad sensorial específica. S: solución de sacarosa al 10%. M: solución de maltodextrina al 10%.

-Test de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP por sus siglas en inglés)

Esta prueba evalúa la preferencia o aversión hacia un contexto previamente condicionado con un determinado alimento. Realizamos la prueba siguiendo el protocolo descrito en Portella et al. (2015) utilizando una jaula dividida en dos compartimentos iguales conectados por una pequeña abertura (Figura 10). Un compartimento estaba completamente iluminado (lado iluminado), mientras que el otro estaba oscurecido para recibir solo el 40 % de la iluminación (lado oscuro). Los roedores son animales nocturnos que prefieren las zonas oscuras. Este test consiste en estudiar si los animales reducen esta preferencia de lugar natural recibiendo un alimento palatable en lado iluminado. La línea base de tiempo de permanencia en el lado iluminado sin alimento se registró el día 1. El entrenamiento con alimento se realizó en los siguientes seis días donde las ratas se colocaron en la jaula por 20 min con libre acceso a ambos lados y en el lado iluminado se colocó comida palatable (oblea sabor chocolate) para generar asociación y preferencia. Durante estos días, los animales recibieron la alimentación estándar con una restricción alimenticia leve, recibiendo el 85% del consumo habitual de alimentos. El día 8 se registró el tiempo de permanencia en el lado iluminado sin alimentos. La diferencia de tiempo registrada en el lado iluminado (asociado con comida palatable) entre el día 1 (línea de base) y el día 8 (tiempo posterior al condicionamiento) fue indicativa del condicionamiento de una preferencia de lugar por comida palatable.

Evaluación de la preferencia de lugar natural	Condicionamiento con alimento deseable	Evaluación de la preferencia de lugar condicionada
Día 1	Día 2-7	Día 8
15' en jaula de test sin alimento	20' en jaula de test con alimento	15' en jaula de test sin alimento



Figura 10. Protocolo e imágenes sin y con alimento palatable del test de condicionamiento de preferencia de lugar.

- Test de ansiedad

Los animales adultos alojados en EE presentaban una conducta diferente a los de SE, más activa y eufórica. Por este motivo, nos pareció interesante someterlos a un test para evaluar si el EE podría estar afectando la ansiedad.

-Test del laberinto elevado en cruz (EPM por sus siglas en inglés)

Este test evalúa la ansiedad de los animales utilizando un laberinto elevado en cruz (Figura 11). Este aparato tiene dos brazos abiertos opuestos (50 cm de largo y 10 cm de ancho) y dos brazos cerrados opuestos (50 cm de largo, 10 cm de ancho y 40 cm de alto), que se extienden desde una plataforma central (10 × 10 cm). Todo el aparato está elevado 50 cm por encima del suelo. El protocolo fue tomado de Enes-Marques & Giusti-Paiva (2018) y Dimitsantos et al. (2007), y se llevó a cabo colocando cada rata en el centro del laberinto alternando hacia cual brazo se enfrentaba durante 5 min. La sesión fue grabada y se registró el número de entradas y el tiempo porcentual de permanencia en cada brazo. El registro de tiempo dentro de una zona o brazo se consideró cuando el animal tenía las cuatro patas dentro de la zona.

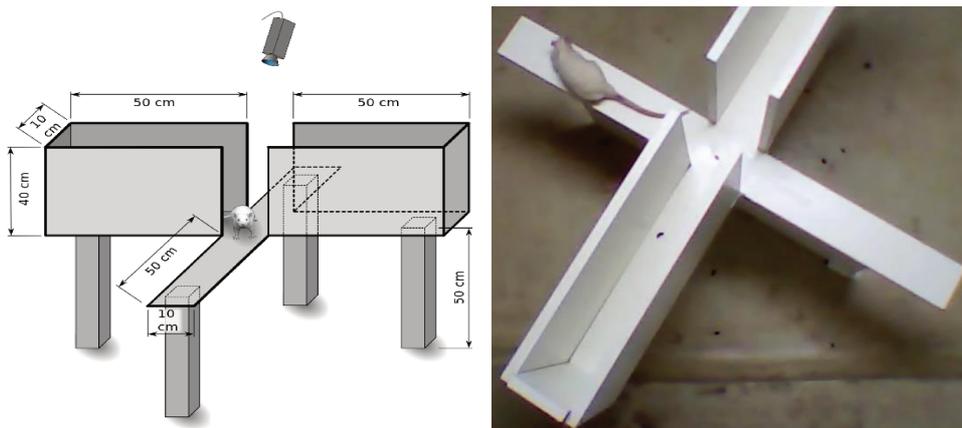


Figura 11. Dispositivo utilizado para el test de laberinto en cruz elevado.

Análisis estadístico

Analizamos los datos obtenidos al destete (PND21) y adultos (PND90) por separado. Para cada grupo de datos y variables, se evaluó la distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Las curvas de peso corporal e ingesta durante la lactancia o luego del destete fueron analizadas por el test de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, considerando el tiempo y los tratamientos como factores. En el caso de encontrar interacción entre los factores, se procedió a estudiar puntos de tiempo independientes utilizando el test más adecuado para ese grupo de datos. Además, para evaluar las diferencias entre animales criados en camada pequeña y normal en DPN21 (SL-DPN21 vs NL-DPN21), se

analizaron los datos mediante la prueba de Mann Whitney o la prueba T de Student, según corresponda, considerando la camada como factor influyente. En cambio, para evaluar las diferencias entre los animales de camada reducida o normal y ambiente estándar o enriquecido (NL-SE 90, SL-SE 90, NL-EE 90 y SL-EE 90) en un momento de tiempo independiente se realizó el análisis por el test de ANOVA de 2 vías, considerando como factores la camada y el ambiente. Particularmente, los datos del estudio de metilación en todos los casos se analizaron por test de Mann Whitney o la prueba T de Student, según corresponda, considerando a la camada como el factor influyente. Por otro lado, el análisis del test SSS se hizo evaluando los datos de las etapas de familiarización y pre-exposición por el test de ANOVA de 2 vías, utilizando como factores los tratamientos (Camada y Ambiente) y las soluciones ofrecidas (Sacarosa o Maltodextrina). Para la etapa de test se realizó el test de ANCOVA, utilizando como factores los tratamientos y la pre-exposición a la solución (Solución pre-expuesta y no pre-expuesta) y como co-variable el consumo de cada solución durante la pre-exposición. El análisis de los datos generados por el test CPP fue analizado individualmente para cada grupo experimental por el test de ANOVA de 2 vías, utilizando como factores el lugar (Luz u Oscuridad) y el condicionamiento por alimento (Pre-condicionamiento o post-condicionamiento). Siempre que se realizó el test de ANOVA de 2 vías y había interacción entre factores, se realizó el post test de comparaciones múltiples de Bonferroni para resolver las diferencias. En todos los casos, los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM) y se consideró significativo un valor de p inferior a 0,05, donde * significaba $p < 0.05$, ** significaba $p < 0.01$, *** significaba $p < 0.001$ y **** significaba $p < 0.0001$. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software estadístico GraphPad Prism Version 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA) o el programa RStudio (2022). Al final del manuscrito, se agregó un anexo estadístico para mostrar los resultados crudos de los análisis donde se debieron utilizar letras en los gráficos para mostrar las diferencias significativamente estadísticas.

7- Resultados

Efectos de la sobrealimentación temprana en ratas en DPN21

- *Peso corporal, tejido adiposo epididimal y niveles de metabolitos en suero*

La curva de peso corporal de las crías desde el nacimiento hasta el destete se muestra en la Figura 12. Allí se puede ver que la sobrealimentación neonatal generó un incremento del peso corporal en el grupo SL-DPN21 en comparación con el grupo NL-DPN21 durante la lactancia. Esta diferencia fue evidente en el DPN7 y fue incrementando hasta el destete, momento en el cual, el grupo SL-DPN21 presentó 30% más de peso corporal que el grupo NL-DPN21 (Figura 12, $p < 0.0001$). Sumado a esto, el grupo SL-DPN21 presentó 43% más de peso del TAE y mayores niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero que el grupo NL-DPN21 (Tabla 3).

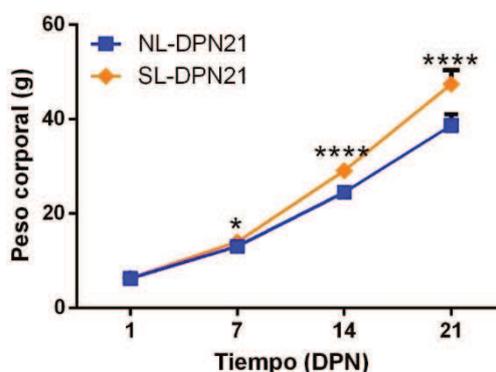


Figura 12. Curva de peso corporal durante el periodo de lactancia de ratas macho criadas en camada normal (NL) y camada reducida (SL). DPN: día postnatal. Los valores se representan como la media \pm SEM según el test de ANOVA de dos vías de medidas repetidas, donde un * refiere a un $p < 0.05$ y **** refiere a un $p < 0.0001$.

Tabla 3. Peso del TAE y niveles plasmáticos de metabolitos en DPN21.

	NL-DPN21	SL-DPN21	Valor de p
TAE (g%)	0.13 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01***	0.0006
Glucosa (mg/dL)	133.7 \pm 4.7	156.6 \pm 6.3*	0.0152
Colesterol (mg/dL)	164.6 \pm 9.8	250.2 \pm 21.6**	0.0087
Triglicéridos (mg/dL)	390.5 \pm 41.8	871.6 \pm 154.8*	0.0173

TAE: tejido adiposo epididimal. NL: camada normal. SL: camada reducida. DPN: día postnatal. Los valores se expresan como la media \pm SEM analizados por el test de Mann Whitney o T de Student según corresponda.

- *Expresión génica de neuropéptidos y receptores hormonales en ARC*

El grupo SL-DPN21 presentó mayores niveles de expresión de los neuropéptidos POMC, CART, NPY (Figura 13 A, $p = 0.001$, $p = 0.04$ y $p = 0.03$ respectivamente) y de los receptores hormonales Ob-Rb, IR y GHSR (Figura 13 B, $p = 0.002$, $p = 0.032$ y $p = 0.020$ respectivamente) en ARC con respecto al grupo NL-DPN21. Por otro lado, la expresión del neuropéptido AgRP no se vio alterada en estos animales (Figura 13 A, NS).

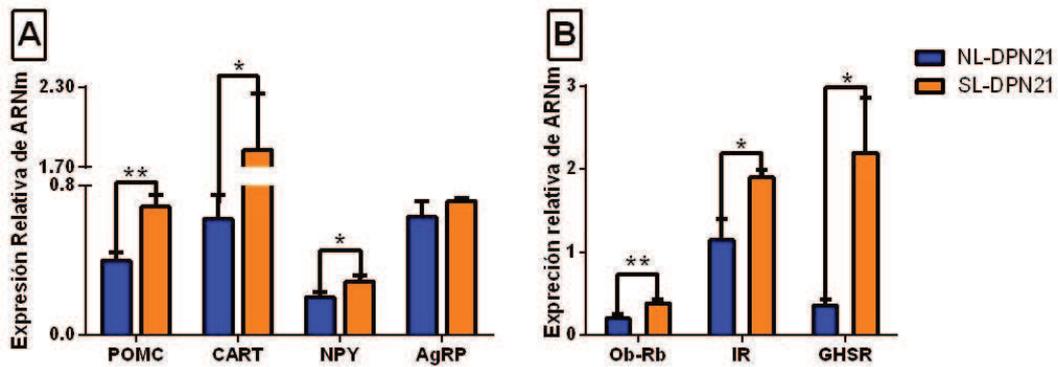


Figura 13. Niveles relativos de expresión de neuropéptidos (A) y receptores hormonales (B) en ARC de ratas macho en DPN21 criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). POMC: proopiomelanocortina; CART: transcripto regulado por cocaína y anfetamina; NPY: neuropéptido Y; AgRP: péptido relacionado con agouti; OB-Rb: receptor de leptina; IR: receptor de insulina; GHSR: receptor de grelina. ARC: Núcleo Arcuato; DPN: día postnatal. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=7/grupo) según la T de Student o el test de Mann Whitney, donde un * refiere a $p < 0.05$ y ** refieren a $p < 0.01$.

- *Metilación del ADN en regiones promotoras de neuropéptidos en ARC*

Basándonos en los cambios de expresión y la importancia de los genes, se estudiaron los patrones de metilación de las regiones promotoras de *Pomc* y *Npy* en ARC. Al analizar la región promotora de *Pomc*, observamos que el grupo SL-DPN21 mostraba una disminución del estado de metilación en el sitio BstU I (b) de la región enhancer nPE1 (Figura 14 A, $p=0.02$) y en el sitio Mae II (c) cercano a la caja TATA (Figura 14 B, $p=0.0002$). En cambio, en la región promotora de *Npy* no observamos alteraciones en el estado de metilación en ninguno de los sitios BstU I estudiados (Figura 14 C, NS).

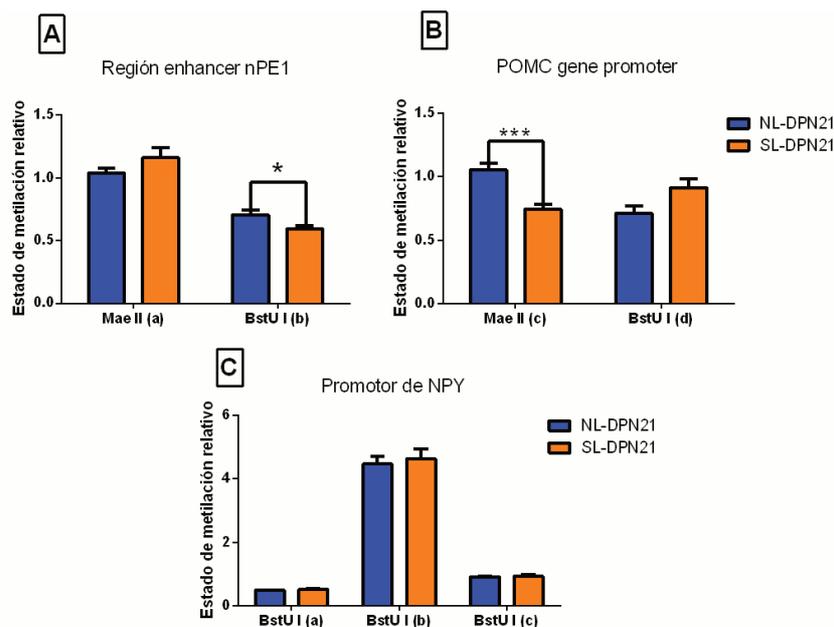


Figura 14. Análisis del estado de metilación de las regiones promotoras de *Pomc* y *Npy* en ARC de ratas macho criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). A: enhancer nPE1 del promotor de *Pomc*. B: promotor de *Pomc*. C: promotor de *Npy*. DPN: día postnatal. Los

valores se representan como la media \pm SEM (n=7/grupo) según la T de Student o el test de Mann Whitney, donde un * refiere a $p < 0.05$ y *** refiere a $p < 0.001$.

- *Expresión génica de moléculas del circuito dopaminérgico mesolímbico y receptores hormonales en ATV*

El grupo SL-DPN21 presentó mayores niveles de expresión de TH y DRD2 ($p=0.0035$ y $p=0.0002$, respectivamente) y menores niveles de expresión de DAT ($p=0.02$) en ATV (Figura 15 A). Por otro lado, este grupo no mostró diferencias significativas en la expresión de receptores hormonales en ATV con respecto al grupo NL-DPN21 (Figura 15 B).

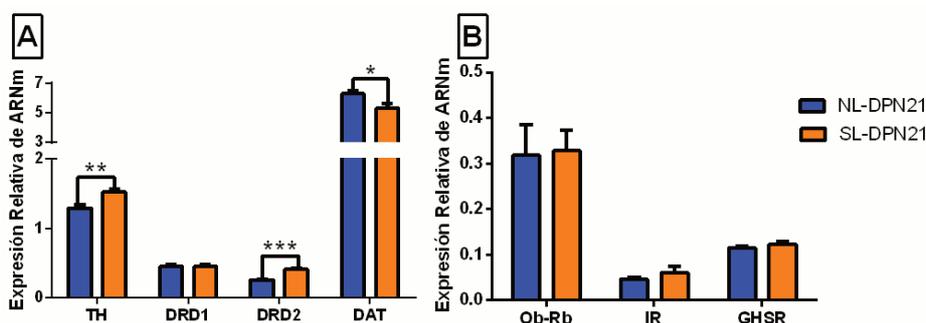


Figura 15. Expresión relativa de ARNm de moléculas de la vía dopaminérgica y receptores hormonales en ratas macho criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). TH: tirosina hidroxilasa; DRD1: Receptor de Dopamina D1; DRD2: Receptor de Dopamina D2; DAT: Transportador activo de Dopamina; Ob-Rb: Receptor de leptina; IR: receptor de insulina; GHSR: Receptor de grelina. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=7/grupo) según la T de Student o el test de Mann Whitney, donde un * refiere a $p < 0.05$, ** refiere a $p < 0.01$ y *** refiere a $p < 0.001$.

- *Expresión génica de moléculas del circuito dopaminérgico mesolímbico en NAc*

El grupo SL-DPN21 mostró mayores niveles de expresión de DAT en NAcC (Figura 16 A, $p=0.0001$), sin diferencias significativas en el resto de los genes estudiados en dicho núcleo, como tampoco en la expresión de los genes estudiados en NAcSh con respecto al grupo NL-DPN21 (Figura 16 A y B).

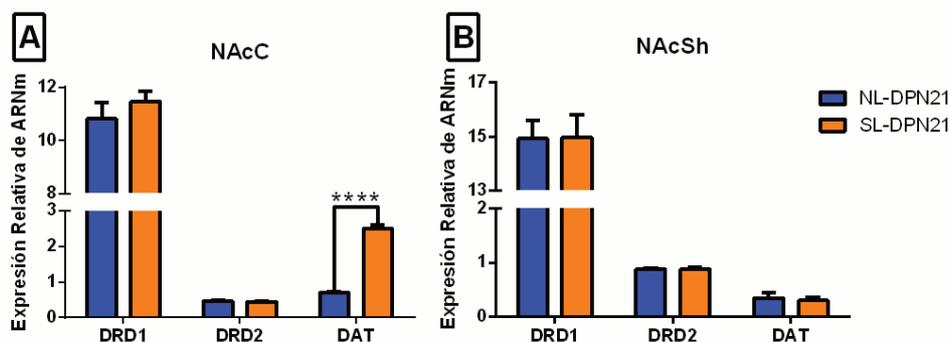


Figura 16. Expresión relativa de ARNm de moléculas de la vía dopaminérgica en ratas macho criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). DRD1: Receptor de Dopamina D1; DRD2: Receptor de Dopamina D2; DAT: Transportador activo de Dopamina. NAcC: Núcleo Accumbens Core; NAcSh: Núcleo Accumbens Shell. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=7/grupo).

± SEM (n=7/grupo) según la T de Student o el test de Mann Whitney, donde **** refiere a $p < 0.0001$.

- *Metilación del ADN en regiones promotoras de Th y Slc6a3*

Basándonos en los cambios de expresión, se estudiaron los niveles de metilación de las regiones promotoras de *Th* en ATV y *Slc6a3* en ATV y NacC. En cuanto a la región promotora de *Th*, el grupo SL-DPN21 mostró un incremento en el estado de metilación en el sitio Mae II (b) (Figura 17 A, $p=0.01$). En la región promotora de *Slc6a3*, el grupo SL-DPN21 presentó una reducción del estado de metilación del ADN en el sitio BstU I (b) en NAcC (Figura 17 C, $p=0.02$), sin cambios en los niveles de metilación en el promotor en ATV (Figura 17 B).

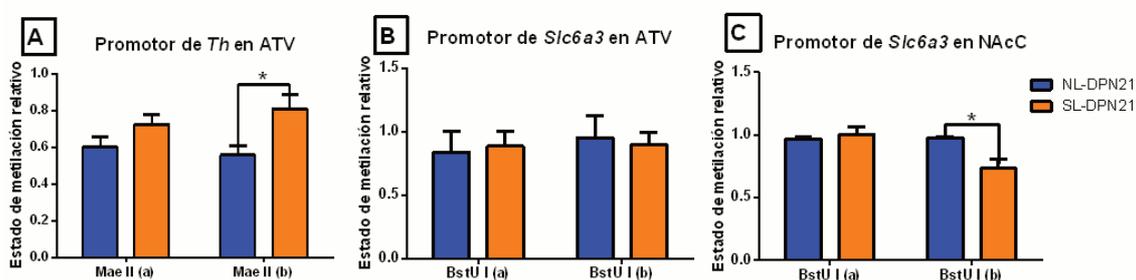


Figura 17. Análisis del estado de metilación de las regiones promotoras de *Th* y *Slc6a3* en ratas macho criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). *Th*: gen de Tirosina Hidroxilasa; *Slc6a3*: gen de Transportador Activo de Dopamina; ATV: área Tegmental ventral; NAcC: núcleo accumbens core. Los valores se representan como la media ± SEM (n=7/grupo) según la T de Student o el test de Mann Whitney, donde un * refiere a $p < 0.05$.

- *Marcación de proteínas*

La marcación proteica de POMC en ARC se realizó por IF en cortes de cerebro de un animal de cada grupo. También se realizó una IF de DAPI como marcador nuclear para observar la morfología del corte. En la Figura 18 se muestran las microfotografías en 4X (fondo) para ver la marcación en el núcleo específico y otras microfotografías en 20X (ampliación) para ver la marcación específica en las neuronas. En las imágenes se puede ver que la marcación de POMC se ve tanto en el soma neuronal como en dendritas y axones, ya que las neuronas de este núcleo expresan el gen de esta proteína. A pesar de no haber realizado una cuantificación, en la microfotografía del grupo SL-DPN21 se puede observar una mayor marcación de la proteína POMC en comparación con la marcación en la microfotografía del grupo NL-DPN21. Esto sería lo esperado para ir en línea con los resultados obtenidos en el estudio de expresión del gen. Sin embargo, se necesitan otras técnicas más precisas con respecto a la cuantificación de proteínas para evaluar más a fondo esta asociación.

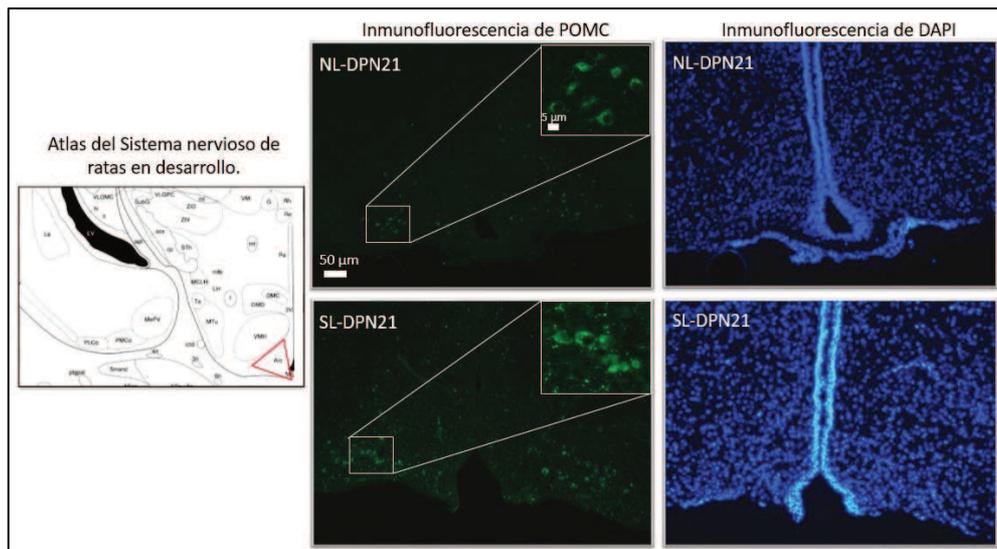


Figura 18. Microfotografía de la inmunofluorescencia de POMC y DAPI en ARC en ratas macho criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). POMC: Pro-opiomelanocortina, ARC: Núcleo Arcuato. La barra blanca representa 50μm en las imágenes de 4X y 5μm en las imágenes de 40X.

La marcación de la proteína TH y la tinción de Nissl se realizaron en ATV por IHQ en cortes de cerebro de un animal de cada grupo. En la Figura 19 se muestran las microfotografías en 4X (fondo) para ver la marcación en el núcleo específico y otras microfotografías en 40X (ampliación) para ver la marcación específica en las neuronas. En las imágenes se puede ver claramente que la marcación de TH en ATV es tanto en somas neuronales como dendritas y axones, ya que es en las neuronas de esta área donde se expresa esta proteína. A pesar de no haber realizado una cuantificación, en la microfotografía del grupo SL-DPN21 se puede observar una mayor marcación de la enzima TH en comparación con la marcación en la microfotografía del grupo NL-DPN21. Esto sería lo esperado para ir en línea con los resultados obtenidos en el estudio de expresión del gen. Sin embargo, se necesitan otras técnicas más precisas con respecto a la cuantificación de proteínas para evaluar más a fondo esta asociación.

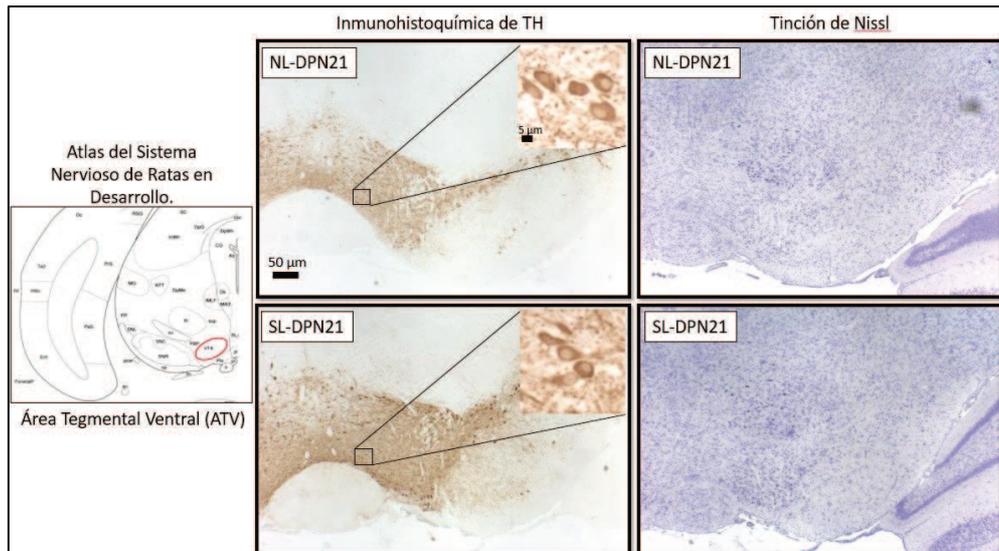


Figura 19. Microfotografías representativas que muestran la inmunohistoquímica de la proteína TH y la tinción de Nissl en ATV de ratas macho criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL) en DPN21. TH: tirosina hidroxilasa; DPN: día postnatal. La barra negra representa 50um en las imágenes de 4X y 5um en las imágenes de 40X.

La marcación de la proteína DRD2 y la tinción de Nissl se realizaron en ATV por IHQ en cortes de cerebro de un animal de cada grupo. En la Figura 20 se muestran las microfotografías en 4X (fondo) para ver la marcación en el núcleo específico y otras microfotografías en 40X (ampliación) para ver la marcación específica en las neuronas. En las imágenes se puede ver que la marcación de DRD2 en ATV es en los somas neuronales tanto como en axones y dendritas, ya que las neuronas de esta área expresan este receptor. A pesar de no haber realizado una cuantificación, en la microfotografía del grupo SL-DPN21 se puede observar una mayor marcación del receptor DRD2 en comparación con la marcación en la microfotografía del grupo NL-DPN21. Esto sería lo esperado para ir en línea con los resultados obtenidos en el estudio de expresión del gen. Sin embargo, se necesitan otras técnicas más precisas con respecto a la cuantificación de proteínas para evaluar más a fondo esta asociación.

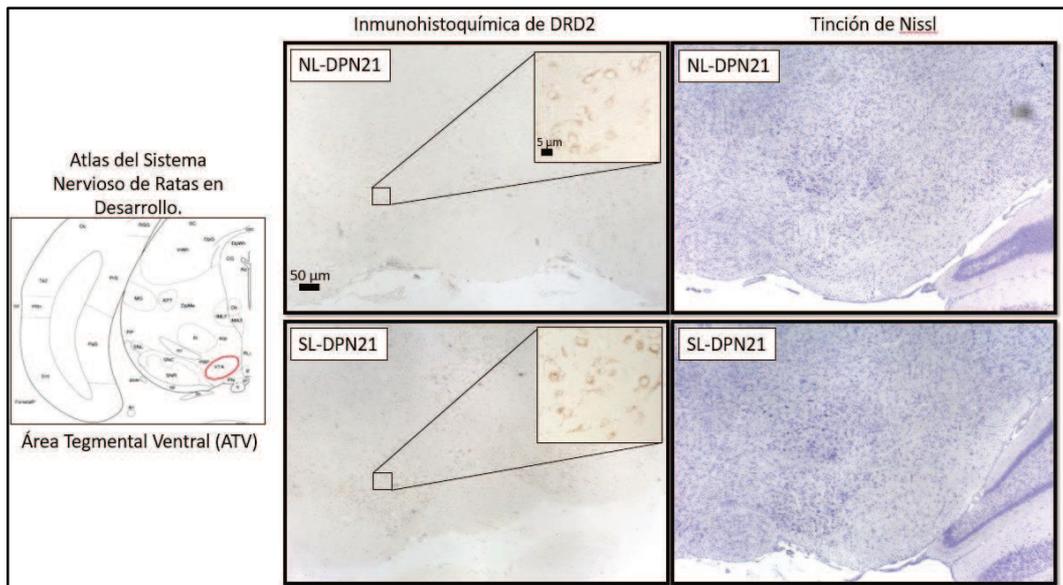


Figura 20. Microfotografías representativas que muestran la inmunohistoquímica de la proteína DRD2 y la tinción de Nissl en ATV de ratas macho criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL) en DPN21. DRD2: receptor de dopamina D2; DPN: día postnatal. La barra negra representa 50µm en las imágenes de 4X y 5µm en las imágenes de 40X.

- *Test de saciedad sensorial específica*

Los resultados del test SSS en ratas recientemente destetadas se muestran en la Figura 21, donde se puede ver el volumen de solución consumida por los animales en cada etapa del test. El grupo SL-DPN21 no presentó diferencias significativas en el consumo de ambas soluciones en las diferentes etapas del test. Por lo tanto, podemos decir que, el grupo SL-DPN21 presentó un comportamiento similar al grupo control o NL-DPN21 en el test SSS.

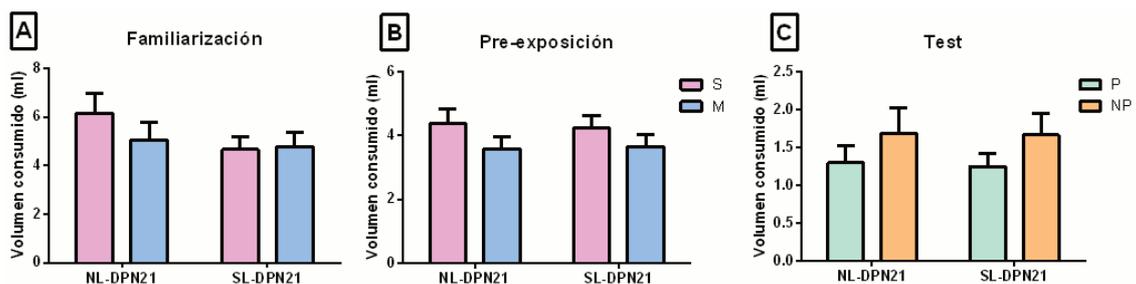


Figura 21. Gráficas del volumen de solución consumido en cada etapa del test SSS por ratas macho recientemente destetadas criadas en camada normal (NL-DPN21) o reducida (SL-DPN21). S: solución de Sacarosa; M: solución de Maltodextrina; P: solución Pre-expuesta; NP: solución No Pre-expuesta. Los valores se representan como la media \pm SEM ($n=14$ /grupo) según el test de ANOVA de dos vías o ANCOVA con post-test de Bonferroni.

Efectos de la sobrealimentación temprana en ratas en DPN90

- *Peso corporal e ingesta durante el tratamiento*

En la Figura 22 se muestra la evolución del peso corporal desde DPN28 a DPN90. El análisis mediante ANOVA de 2 vías de medidas repetidas con todos los grupos experimentales mostró que la camada reducida generó un aumento del peso corporal ($p < 0.0001$) mientras que el EE lo disminuyó ($p < 0.0001$). Además, estos dos factores presentaron interacción significativa ($p < 0.0001$), por lo tanto, se realizó un ANOVA de 2 vías con los factores ambiente y camada con post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni, de los cuales aquí se detallan los puntos relevantes de la curva. Se puede ver la información detallada sobre el análisis de estos resultados en el anexo estadístico al final del manuscrito. Uno de estos puntos fue el DPN56, que es un punto intermedio en el estudio y además parece ser un punto de quiebre en las diferencias de peso entre algunos grupos (Figura 23). Su análisis mostró efectos de la camada ($p < 0.0001$) y del ambiente ($p = 0.0046$), con interacción relevante entre los factores ($p = 0.037$). El post-test realizado en este punto detalló que ambos grupos de camada reducida era más pesados que sus controles en el mismo ambiente ($p = 0.01$ para SE y $p < 0.0001$ para EE). Pero, el grupo NL-EE 90 era más liviano que el grupo NL-SE 90 ($p = 0.0034$), mientras que los grupos SL-SE 90 y SL-EE 90 no mostraban diferencias en su peso corporal. Por lo tanto, en DPN56, la camada reducida aumentó el peso corporal y el EE redujo el peso corporal pero solo en animales NL. El otro punto particular que detallamos fue DPN90 por ser el punto de finalización y donde se hacen el resto de los estudios. Su análisis por ANOVA de dos vías con los factores camada y ambiente, mostró que el ambiente enriquecido disminuyó el peso corporal. Por lo tanto, al finalizar el experimento solo permaneció el efecto del ambiente ($p < 0.0001$) mientras que el efecto de la camada ya no fue significativo ($p = 0.1$).

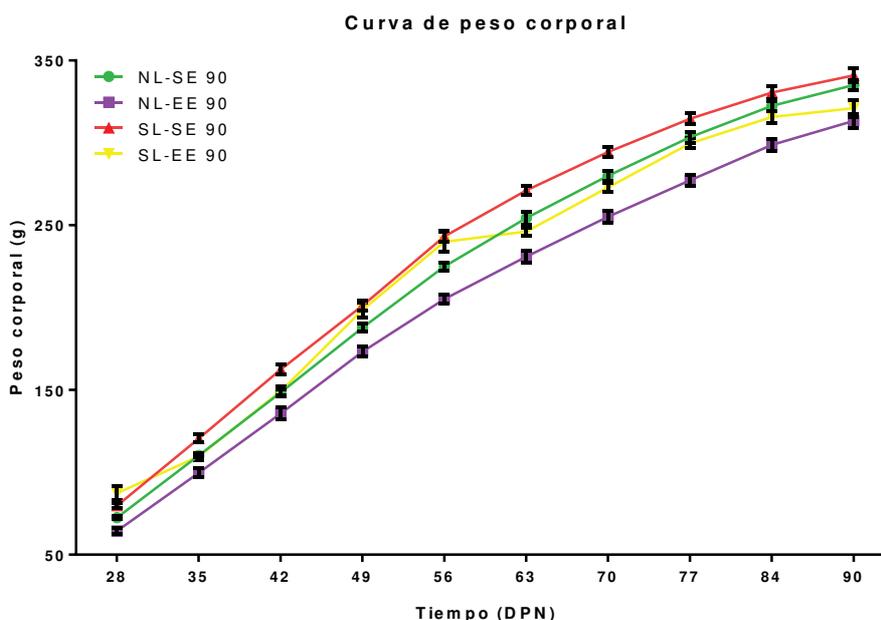


Figura 22. Curvas de peso corporal durante el tratamiento para ratas macho criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) alojadas en ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). Los valores se representan como la media \pm SEM (n=14/grupo). Este gráfico no muestra los resultados del test estadístico.

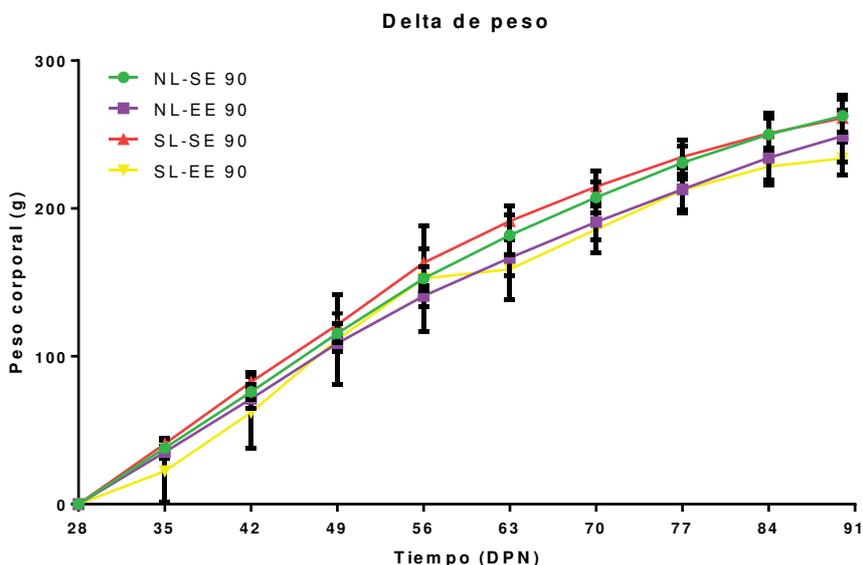


Figura 23. Curvas de delta de peso corporal durante el tratamiento para ratas macho criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) alojadas en ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). Los valores se representan como la media \pm SEM (n=14/grupo). Este gráfico no muestra los resultados del test estadístico.

Luego del destete y durante el tratamiento los animales fueron alimentados con pellet de alimento balanceado, que fue pesado semanalmente para obtener las curvas de ingesta que se muestra en la Figura 24. El análisis mediante ANOVA de 2 vías de medidas repetidas considerando los factores camada y ambiente, mostró efectos de la camada reducida ($p=0.008$) y del EE ($p<0.0001$). Además, estos factores presentaron una interacción significativa ($p<0.0001$), por lo tanto, se realizó un ANOVA de 2 vías, considerando ambos factores seguido de un post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni, solo en puntos relevantes de la curva. Se puede ver la información detallada sobre el análisis de estos resultados en el anexo estadístico al final del manuscrito. Uno de los puntos fue el DPN35, donde se da el primer pico de disminución de ingesta como efecto del EE. Su análisis mostró efecto de la reducción de camada ($p=0.004$), efectos del EE ($p=0.007$) y una interacción significativa entre estos factores ($p=0.0227$). El post-test en DPN35 mostró que el grupo NL-EE 90 presentaba menor ingesta que el resto (vs NL-SE 90, $p=0.0146$; vs SL-SE 90, $p=0.0007$; vs SL-EE 90, $p=0.0014$), evidenciando el efecto de reducción de ingesta del EE solo en el grupo de camada normal. Por otra parte, analizamos los días DPN49, DPN56 y DPN63, en los cuales el análisis mostró

una disminución de la ingesta por el efecto del EE ($p=0.0340$; $p=0.0044$; $p=0.0022$, respectivamente), sin efectos significativas de la camada reducida ($p>0.5$). Por último, el análisis en DPN90 no mostró efectos por los factores ni su interacción ($p>0.2$). Por lo tanto, al finalizar el tratamiento, la ingesta de los animales no estaba alterada por la camada reducida o el EE.

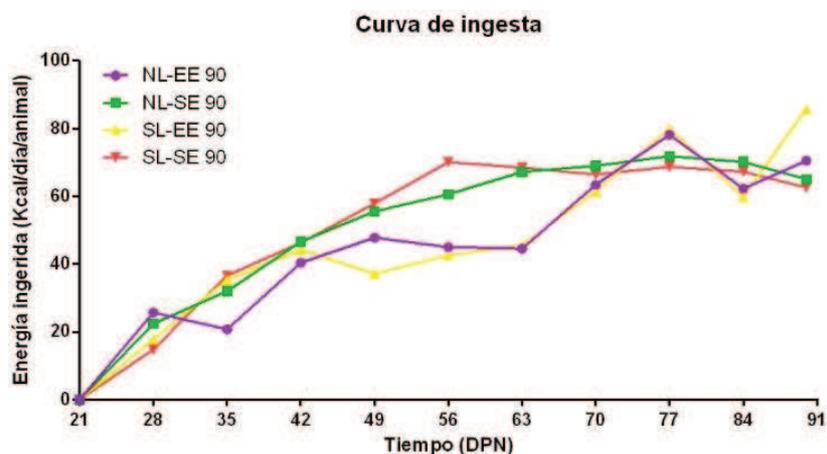


Figura 24. Curvas de ingesta durante el tratamiento para ratas macho criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) alojadas en ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). Los valores se representan como la media \pm SEM ($n=14$ /grupo).

- *Peso del tejido adiposo epididimal y niveles de metabolitos en suero*

La tabla 4 muestra las comparaciones del peso de TAE y metabolitos en suero en animales en DPN90. El peso del TAE fue incrementado por la camada reducida ($p=0.0281$), mientras que el EE lo redujo ($p=0.0175$). Con respecto a los metabolitos en suero (Tabla 4), la camada reducida no afectó estos parámetros. El EE no afectó los niveles de glucosa y triglicéridos en suero, pero, mostró diferencias significativas en los niveles de colesterol en suero con respecto al SE para ambas camadas ($p=0.0004$).

Tabla 4. Peso del TAE y niveles de metabolitos en suero en DPN90.

	NL-SE 90	NL-EE 90	SL-SE 90	SL-EE 90
TAE (g%)	2.68 \pm 0.09 _a	2.53 \pm 0.09 _b	2.92 \pm 0.08 _c	2,66 \pm 0.07 _a
Glucosa (mg/dL)	116.2 \pm 1.5	110.6 \pm 5.8	120.6 \pm 2.8	120.1 \pm 2.9
Colesterol (mg/dL)	64.98 \pm 3.11 _a	77.15 \pm 1.95 _b	63.51 \pm 3.83 _a	76.13 \pm 2.27 _b
Triglicéridos (mg/dL)	291.2 \pm 37.2	269.9 \pm 12.3	334.8 \pm 24.1	281.3 \pm 9,181

TAE: tejido adiposo epididimal. NL: camada normal. SL: camada reducida. SE: ambiente estándar. EE: ambiente enriquecido. Los valores se representan como la media \pm SEM ($n=14$ /grupo) con comparaciones según el test de ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni, donde las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos con $p<0.05$.

- *Expresión génica de neuropéptidos y receptores hormonales en ARC*

En la Figura 25 A se pueden ver las gráficas de expresión de los neuropéptidos en ARC en animales en DPN90. La expresión del neuropéptido POMC fue incrementada por EE ($p=0.0012$), mientras que la expresión de CART no se vio afectada por los factores. Por otro lado, la expresión del neuropéptido NPY fue disminuida por la reducción de camada ($p=0.0031$). En cambio, la expresión del neuropéptido AgRP mostró un efecto de interacción entre los factores ($p=0.0013$). El post-test mostró que el grupo SL-SE 90 presentaba menor expresión de AgRP que los grupos NL-SE 90 ($p=0.0244$) y SL-EE 90 ($p=0.0151$), mientras que SL-EE 90 y NL-EE 90 no presentaban diferencias en su expresión ($p=0.4$).

En la Figura 25 B se pueden ver las gráficas de expresión de los receptores hormonales en ARC de animales en DPN90. La expresión de los receptores Ob-Rb e IR fueron disminuidas por el ambiente ($p=0.0003$ y $p=0.0094$, respectivamente). Por otro lado, la expresión de GHSR fue afectada por la reducción de camada ($p=0.0008$) y el ambiente ($p<0,0001$), además, estos efectos presentaban interacción entre los factores ($p=0.0125$). Luego, el post-test reveló que el grupo NL-EE 90 presentó menor expresión de GHSR que el resto de los grupos NL-SE 90 ($p<0.0001$), SL-SE 90 ($p<0.0001$) y SL-EE 90 ($p=0.0005$).

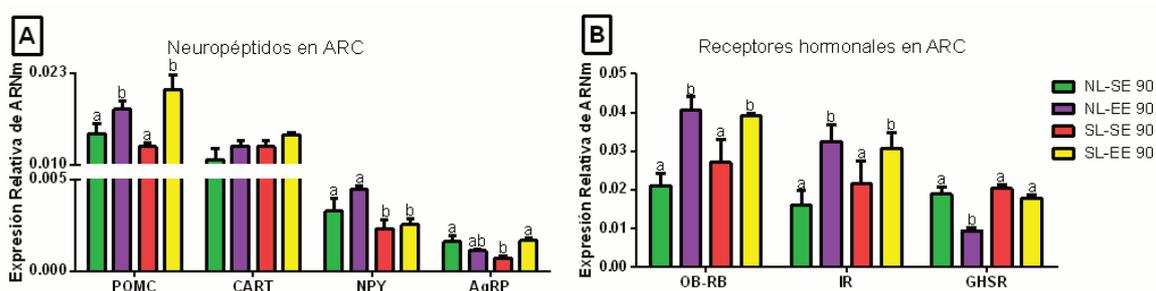


Figura 25. Niveles relativos de ARNm de neuropéptidos (A) y receptores hormonales (B) en ARC de ratas macho en DPN90 criadas en camada normal (NL) o reducida (SL), en ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). POMC: proopiomelanocortina; CART: Transcripto Regulado por Cocaína y Anfetamina; NPY: Neuropéptido Y; AgRP: Péptido Relacionado con Agoutí; Ob-Rb: receptor de leptina; IR: receptor de insulina; GHSR: receptor de grelina. ARC: Núcleo Arcuato. DPN: Día Postnatal. Los valores se representan como la media \pm SEM ($n=7$ /grupo) según el test de ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni, donde las diferentes letras indican la diferencia significativa con un $p<0.05$.

- *Metilación del ADN en regiones promotoras de neuropéptidos en ARC*

Basándonos en los resultados de metilación animales en DPN21, en DPN90 se estudió la metilación de la región enhancer y promotora de *Pomc* en ARC para los diferentes ambientes por separado (Figura 26). En la Figura 26 A se puede ver que, el grupo SL-SE 90 mostró un incremento en el nivel de metilación en los sitios estudiados en la región enhancer nPE1, *Mae* II (a) ($p=0.0087$) y *Bst*U I (b) ($p=0.0012$), con respecto al grupo NL-SE 90. Este grupo también mostró una disminución en los niveles de

metilación en los sitios estudiados en el promotor de *Pomc*, *Mae II* (c) ($p=0.0086$) y *BstU I* (d) ($p=0.0108$), con respecto al grupo NL-SE 90. Por otro lado, en la Figura 26 B, se puede ver que el grupo SL-EE 90 mostró un mayor nivel de metilación en el sitio *Mae II* (c) estudiado en el promotor de *Pomc* ($p=0.0413$) con respecto al grupo NL-EE 90.

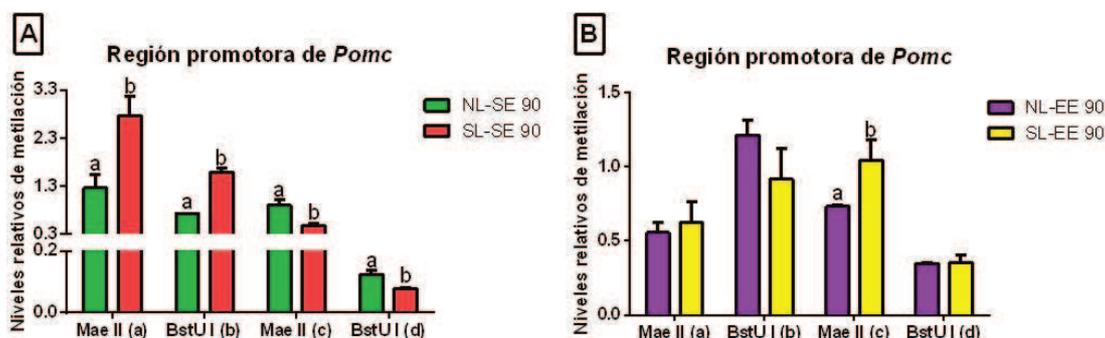


Figura 26. Análisis del estado de metilación de la región promotora y enhancer de *Pomc* en ARC de ratas macho en DPN90 criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) y expuestas a: [A] un ambiente estándar (SE) o [B] un ambiente enriquecido (EE). DPN: día postnatal. Los valores se representan como la media \pm SEM ($n=7$ /grupo) según el test de Mann Whitney o T de Student según corresponda, donde las diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$.

- *Expresión génica de moléculas del circuito dopaminérgico mesolímbico y receptores hormonales en el ATV*

En la Figura 27 se muestran las comparaciones de expresión de moléculas de interés en ATV de animales en DPN90. En la figura 27 A, se puede ver que la expresión de DRD1 se vio incrementada por EE ($p=0.0027$). Además, se puede ver que la expresión del resto de los genes estudiados no se vio afectada por los factores reducción de camada o EE. Por otro lado, en la Figura 27 B, se puede ver que la expresión de Ob-Rb se vio afectada por el EE ($p=0.0038$). La expresión de IR también tuvo un efecto del EE ($p=0.0157$), pero como mostró una interacción significativa entre los factores ($p=0.0125$), se analizó también el post-test. En este último se vio que el grupo NL-EE 90 presentaba mayor expresión de IR que el grupo NL-SE 90 ($p=0.0229$) y que el grupo SL-SE 90 ($p=0.0290$), mientras que el grupo SL-EE 90 no mostró diferencias en la expresión de IR con respecto a NL-EE 90 ni SL-SE 90. Además, se vio que la expresión de GHSR se vio afectada por la camada ($p=0.0306$) y el ambiente ($p=0.0062$), donde es interesante resaltar la tendencia del valor p de la interacción ($p=0.0537$).

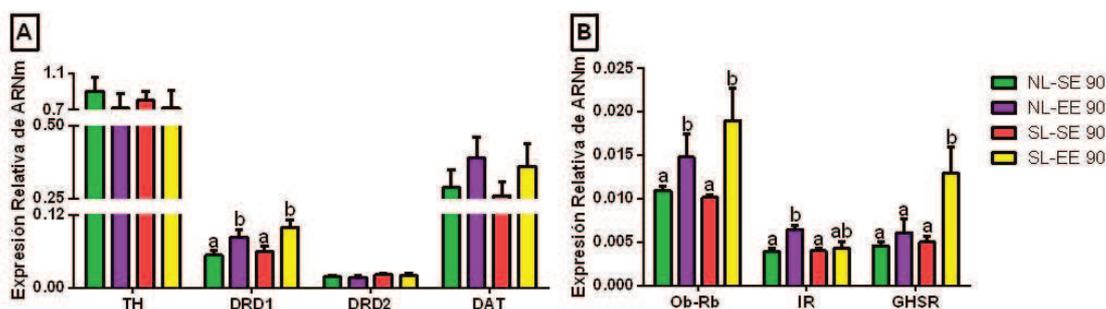


Figura 27. Expresión relativa de ARNm de moléculas de la vía dopaminérgica [A] y receptores hormonales [B] en el ATV de ratas macho en DPN90 criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) y expuestas al ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). TH: Tirosina Hidroxilasa; DRD1/2: Receptor de Dopamina D1/D2; DAT: Transportador Activo de Dopamina. ATV: Área Tegmental Ventral. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=7/grupo) según el test de ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni, donde las diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$.

- *Metilación del ADN en regiones promotoras en ATV*

Los patrones de metilación del ADN se analizaron para las regiones promotoras de *Th* y *Slc6a3* en ATV en DPN90 para los diferentes ambientes por separado. La Figura 28 muestra los resultados del análisis para cada ambiente. En el promotor *Th*, el grupo SL-SE 90 mostró mayores niveles de metilación en los sitios Mae II (a) y (b) (Figura 28 A, $p(a) = 0.0079$ y $p(b) = 0,01$). No se vieron alteraciones en la metilación del promotor de *Th* en animales en EE (Figura 28, C). En cuanto al promotor de *Slc6a3*, el grupo SL-SE 90 mostró niveles reducidos de metilación en el sitio BstU I (a) (Figura 28 B, $p = 0.0003$), mientras que el grupo SL-EE 90 mostró niveles aumentados de metilación en los sitios BstU I (a) y (b) (Figura 28 D, $p(a)=0,0022$ y $p(b)=0,0023$).

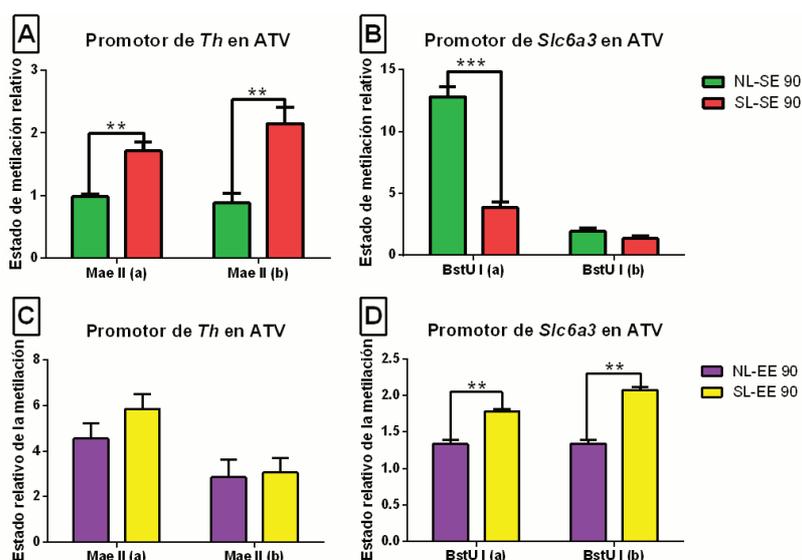


Figura 28. Estado de metilación relativo de los promotores de interés en ratas macho criadas en camada normal (NL) o pequeña (SL) y ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE) en DPN90. *Th*: gen de la tirosina hidroxilasa; *Slc6a3*: Gen transportador activo de dopamina. ATV: área tegmental ventral. Los valores se expresan como media \pm SEM (n=7/grupo), *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ mediante la prueba T de Student o la prueba de Mann Whitney.

- *Expresión génica de moléculas del circuito dopaminérgico mesolímbico en NAc*

En la Figura 29 se muestran las comparaciones de expresión de los genes de interés en ambas regiones del NAc. En la Figura 29 A, se puede ver que la expresión de DRD1 y DAT en NAcC se vio disminuida por el ambiente ($p=0.0014$ y $p=0.0096$, respectivamente). En la Figura 29 B, se ve que la expresión de DRD1 en NAcSh muestra un efecto de interacción entre factores ($p=0.049$). El post-test mostró que el grupo SL-

SE 90 presentaba una menor expresión de DRD1 que el grupo NL-SE 90 ($p=0.047$), mientras que esta alteración no se observó en los mismos animales en EE (SL-EE 90). La expresión de DRD2 en NAcSh también se vio afectada por la interacción entre los factores ($p=0.0282$). Luego, el post-test mostró que el grupo SL-SE 90 presentaba mayor expresión de DRD2 que el resto de los grupos (NL-SE 90, $p=0.041$; NL-EE 90, $p=0.017$; SL-EE 90, $p=0.027$), y esta alteración no se observó en los mismos animales en EE (SL-EE 90).

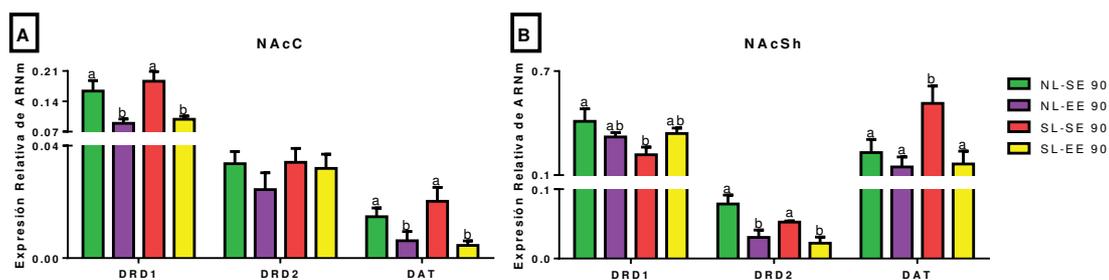


Figura 29. Expresión relativa de ARNm de moléculas de la vía dopaminérgica en ratas macho en DPN90 criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) y expuestas a un ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). DRD1/2: Receptor de Dopamina D1/D2; DAT: Transportador Activo de Dopamina. NAcC: Núcleo Accumbens Core; NAcSh: Núcleo Accumbens Shell. Los valores se presentan como la media \pm SEM ($n=7$ /grupo) según el test de ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni, donde las diferentes letras indican diferencias significativas con $p<0.05$.

- *Metilación del ADN en regiones promotoras en NAc*

Los patrones de metilación del ADN se analizaron para las regiones promotoras de *Drd1* en NAcSh y *Slc6a3* en NAcC y NAcSh. Los resultados del análisis para animales en DPN90 en sus respectivos ambientes se muestran en la Figura 30. En el promotor de *Drd1* se vio una disminución del nivel de metilación el grupo SL-EE 90 con respecto al grupo NL-EE 90 (Figura 30 F, $p=0.049$), mientras que no se vieron diferencias entre los grupos SL-SE 90 y NL-SE 90 (Figura 30 C). Con respecto al promotor de *Slc6a3*, el grupo SL-SE 90 mostró niveles aumentados de metilación en los sitios BstU I (a) y (b) en NAcSh (Figura 30 B, $p(a)=0,0014$ y $p(b)=0,0017$), sin cambios en la metilación en NAcC (Figura 30 A). En cambio, el grupo SL-EE 90 mostró aumento en los niveles de metilación en el sitio BstU I (b) en NAcC (Figura 30 D, $p=0.0233$) y niveles disminuidos de metilación en el sitio BstU I (a) en NAcSh (Figura 30 E, $p=0.035$) Por otro lado, los animales SL-PND90 no mostraron diferencias en los niveles de metilación de los sitios promotores estudiados en NAcC (Figura 30 D).

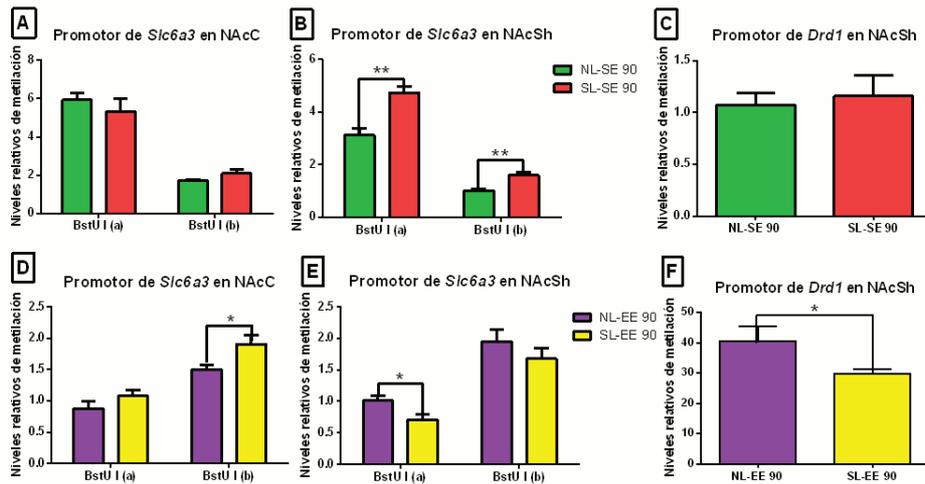


Figura 30. Estado de metilación relativo de los promotores de interés en ratas macho criadas en camada normal (NL) o pequeña (SL) y ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE) en DPN90. *Drd1*: Gen del receptor de dopamina D1; *Slc6a3*: Gen del transportador activo de dopamina; NAcC: núcleo accumbens core; NAcSh: núcleo accumbens Shell. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=7$ /grupo), * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ mediante la prueba T de Student o la prueba de Mann Whitney.

- *Test de saciedad sensorial específica*

El volumen de las dos soluciones consumidas durante las diferentes etapas de la prueba SSS se muestra en la Figura 31. En la etapa de familiarización (Figura 31 A), todos los grupos consumieron ambas soluciones por igual. Sin embargo, durante la etapa de pre-exposición y test se observó un efecto de la interacción de factores ($p=0,0101$ y $p=0,0198$). El post-test mostró que el grupo SL-SE 90 presentaba una mayor ingesta de S (Figura 31 B, $p=0,0094$) y de solución pre-expuesta (Figura 31 C, $p=0,0183$). Este comportamiento no se observó en los grupos control, NL-SE 90 ni NL-EE 90, así como tampoco en el grupo SL-EE 90.

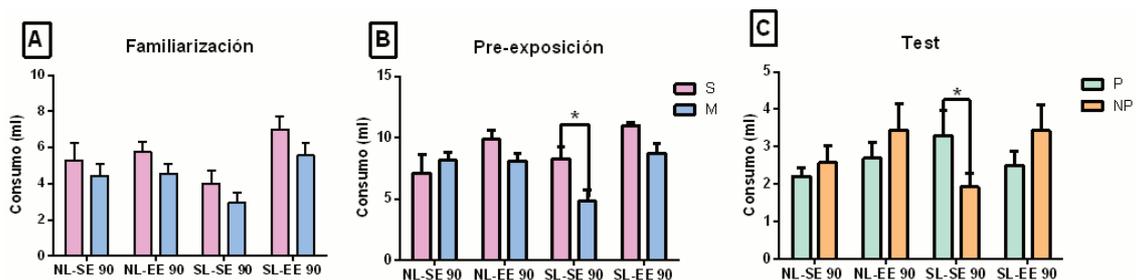


Figura 31. Volumen de solución consumida medido en mililitros (ml) en cada etapa del test SSS para ratas macho criadas en camada normal (NL) o pequeña (SL) y ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE) en DPN90. A) Etapa de familiarización; B) Etapa de pre-exposición; C) Etapa de Test. S: solución de sacarosa; M: solución de maltodextrina; P: solución pre-expuesta; NP: solución no pre-expuesta. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=14$ /grupo), donde * $p < 0,05$ mediante el test de ANOVA o ANCOVA según corresponda con una prueba posterior de Bonferroni.

- *Test de condicionamiento de preferencia de lugar*

En la Figura 32 se pueden ver las gráficas de los resultados del test CPP. Allí, se puede ver que los grupos NL-SE 90, NL-EE 90 y SL-SE 90 (Figura 32 A, B, y C, respectivamente) presentaron un efecto significativo de la iluminación, mostrando que permanecieron mayor tiempo en el lado oscuro de la jaula ($p < 0.0001$, $p = 0.0185$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Este comportamiento es el esperado y no fue afectado por el factor de condicionamiento con un alimento palatable. En cambio, el grupo SL-EE 90 mostró una interacción significativa entre los factores de iluminación y condicionamiento con alimento (Figura 32 D, $p = 0.0129$), sin embargo, el post-test no evidenció diferencias significativas en el comportamiento de este grupo.

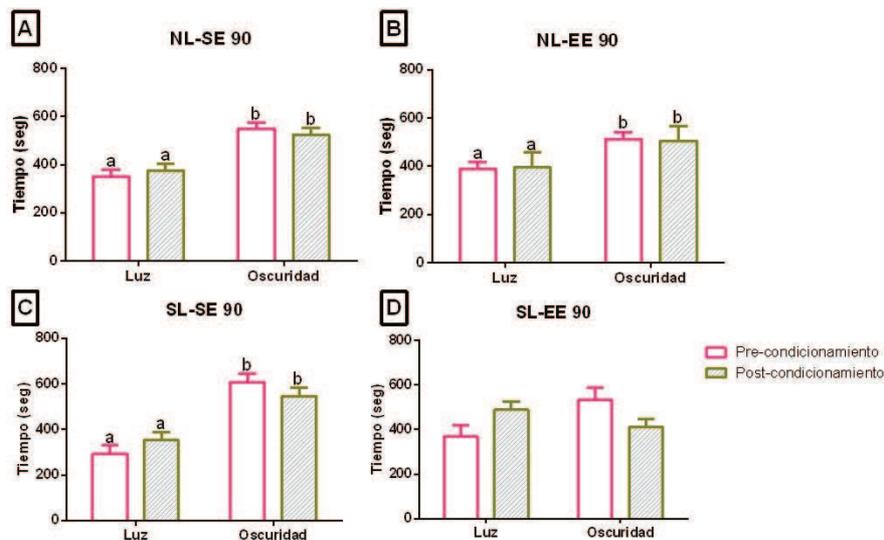


Figura 32. Gráficas del tiempo de permanencia en cada lado de la jaula durante el test CPP para ratas macho adultas criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) y expuesta a un ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). Los valores se presentan como la media \pm SEM ($n = 14$ /grupo) según el test ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni, donde las diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$.

- *Test de laberinto elevado en cruz*

En la Figura 33 se pueden ver los resultados del test EPM. En esta figura se puede ver que el número de entradas en brazo cerrado (A) y el tiempo en el brazo cerrado (B) se ven disminuidos por el EE ($p = 0.0167$ y $p = 0.0017$, respectivamente). En cambio, el tiempo en el brazo abierto se vio disminuido por el factor de reducción de camada (Figura 33 B, $p = 0.0326$).

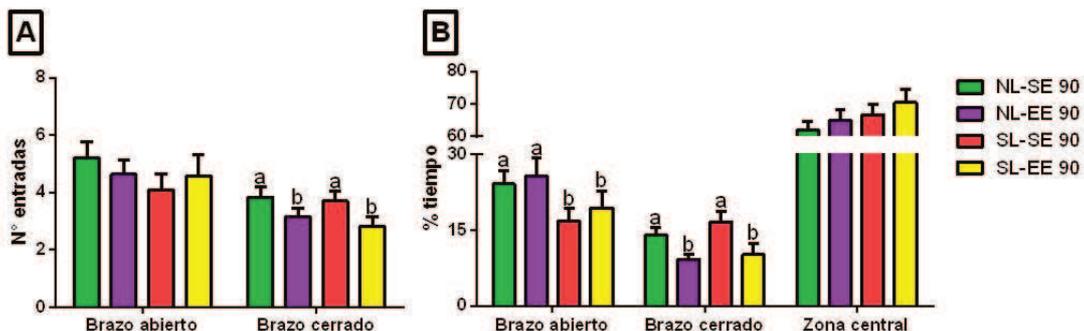


Figura 33. Graficas del N° de entradas y porcentaje de tiempo de permanencia en las zonas del laberinto para ratas macho adultas criadas en camada normal (NL) o reducida (SL) expuestos a un ambiente estándar (SE) o enriquecido (EE). Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=14/grupo) según el test ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni, donde las diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$.

8- Discusión de Resultados

Se ha establecido que criar ratas en camadas pequeñas induce la sobrealimentación neonatal y conduce al desarrollo temprano de obesidad (Enes-Marques & Giusti-Paiva, 2018; Habbout et al., 2013; Plagemann et al., 2012). Por otro lado, también se ha determinado que el entorno ambiental tiene efectos positivos sobre la salud y particularmente el EE podría tener efectos que disminuyen el riesgo de desarrollar obesidad (Cao et al., 2004, 2013; Kong et al., 2015; Mohammed et al., 2002; Nicolaidis, 2019; Rossetti et al., 2015). Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos de la sobrealimentación neonatal en el circuito del control homeostático (Habbout et al., 2013; Plagemann et al., 2012), e incluso, no han sido estudiados los efectos en el circuito dopaminérgico en un día de vida tan temprano como es el destete. Además, se conoce muy poco acerca de los efectos del EE sobre el control de la ingesta y menos aún los efectos a nivel molecular que involucra. Incluso, este es el primer estudio que involucra ambos factores para evaluar cómo podrían interactuar. Comprender los mecanismos cerebrales involucrados en el desarrollo temprano de la obesidad, sus efectos a largo plazo y la influencia del entorno ambiental podría ayudarnos a comprender cómo prevenir o reducir la susceptibilidad a desarrollar obesidad temprana y en la edad adulta. Es por esto que este estudio evaluó los efectos de la sobrealimentación neonatal sobre los circuitos cerebrales del control homeostático y el circuito dopaminérgico mesolímbico como parte del control hedónico de la ingesta en ratas al destete. También, se evaluó si estas alteraciones involucraban mecanismos epigenéticos de regulación y si podían tener efectos en el comportamiento de los animales. Además, todos estos estudios se realizaron en ratas adultas con ambiente estándar para evaluar cómo la sobrealimentación neonatal puede afectar a largo plazo, y, por otro lado, en ratas adultas con ambiente enriquecido para evaluar si éste puede prevenir o revertir los efectos de la sobrealimentación neonatal en la adultez.

I- Sobrealimentación neonatal y sus efectos al destete

Durante la lactancia, las ratas criadas en camadas pequeñas aumentaron significativamente su peso corporal, tal como se había informado previamente (Argente-Arizón et al., 2016; Bei et al., 2015; Rodrigues et al., 2009; Schmidt et al., 2001; Stefanidis & Spencer, 2012). Vimos que las diferencias de peso corporal entre las ratas SL-DPN21 y NL-DPN21 fueron evidentes desde el DPN7, igual que en otros estudios (Carvalho et al., 2016; Enes-Marques & Giusti-Paiva, 2018; Plagemann et al., 2009; Rodrigues et al., 2009). Al finalizar la lactancia, las ratas SL-DPN21 pesaban un 30% más que las NL-DPN21, y presentaban mayor peso del TAE y niveles plasmáticos elevados de glucosa, colesterol y triglicéridos, lo que iba en acuerdo con lo informado

por otros estudios (Argente-Arizón et al., 2016; Enes-Marques & Giusti-Paiva, 2018; Plagemann et al., 2009; Rodrigues et al., 2011). Estos resultados indicaron que las ratas SL-DPN21 presentaban obesidad y rasgos característicos del síndrome metabólico al finalizar la lactancia.

El control homeostático de la ingesta regula el balance de energía mediante el aumento de la motivación por comer tras el agotamiento de las reservas de energía (Saper et al., 2002). El ARC, es el principal núcleo de este circuito y actúa como sensor del estado energético del cuerpo e inicia respuestas aguas arriba por medio de los neuropéptidos (Barsh & Schwartz, 2002). El grupo SL-DPN21 mostró una mayor expresión del neuropéptido orexigénico NPY en ARC. Este resultado está de acuerdo con otros autores que informaron una mayor expresión del gen NPY (López et al., 2005), una mayor cantidad de neuronas positivas para NPY (Heidel et al., 1999; Plagemann et al., 1999) y una mayor densidad de fibras NPY (Sominsky et al., 2017b) en el ARC de animales de camada reducida. Sin embargo, al igual que Plagemann et al. (2009), no vimos que estos cambios en NPY se relacionen con alteraciones en el estado de metilación del promotor del gen. Inversamente, observamos un aumento de la expresión de los neuropéptidos anorexigénicos POMC y CART en el ARC de ratas SL-DPN21. Esto también va de acuerdo con lo observado en la inmunomarcación de POMC en ARC de animales SL-DPN21. Nuestro grupo (Lazzarino et al., 2017) y otros (Kinzig et al., 2005) informaron resultados similares en la expresión de neuropéptidos anorexigénicos en diferentes modelos de obesidad. En línea con la mayor expresión de POMC, encontramos que dos regiones estudiadas en su promotor se encontraban hipometiladas. Una de éstas se ubica en la región potenciadora nPE1 y controla la expresión específica del gen en el hipotálamo (Coupé et al., 2010). La otra región hipometilada contiene sitios de unión a los FT SP1/NF- κ B, STAT3 y nGRE. Ambas regiones están involucradas en la regulación de la expresión de POMC por leptina. En particular, el sitio de unión de Sp1 en el promotor de *Pomc* es clave para mediar los efectos de la leptina en la expresión de POMC (Marco et al., 2014; Yang et al., 2009). Se sabe que las hormonas leptina e insulina activan las neuronas POMC/CART y simultáneamente inhibe las neuronas NPY/AgRP, suprimiendo así la alimentación (Cabral et al., 2014; Cowley et al., 2001; Schwartz et al., 2000). Varios autores han informado que las ratas de camada reducida son hiperleptinémicas e hiperinsulinémicas en DPN21, como se esperaba en función de las mayores cantidades de depósitos de grasa (López et al., 2005; Plagemann et al., 2009; Rodrigues et al., 2011; Sominsky et al., 2017b). Nuestros resultados van mejor con lo descrito por estos autores ya que, los animales SL-DPN21 presentaron mayor expresión de los receptores hormonales específicos, Ob-Rb e IR, en ARC. Además, esto iría de acuerdo también con el aumento

en la expresión de los neuropéptidos anorexigénicos, POMC y CART, y la hipometilación en el promotor de *Pomc* como se mencionó anteriormente. Sin embargo, no concuerdan con el aumento en la expresión de NPY ya que leptina es uno de los principales inhibidores de la expresión de este neuropéptido por medio de la acción de STAT3 sobre su promotor (Higuchi et al., 2005; Muraoka et al., 2003). En relación a esto, Plagemann et al. (2009) sugirió que los animales de camada reducida en DPN21 podrían presentar una resistencia de la región promotora de *Npy* a los efectos de leptina. Además, otros autores reportaron un estado de resistencia a la leptina con respuesta p-STAT3 alterada en ARC y VMH en ratas de camada reducida en PND12 (Rodrigues et al., 2011; Sominsky et al., 2017b). Esta resistencia del promotor podría ser posible en etapas tempranas considerando a NPY como el neuropéptido orexigénico más poderoso y de vital importancia para la supervivencia (Larhammar et al., 1987). Se podría especular que, al menos al inicio del desarrollo, la regulación negativa de NPY se encuentra atenuada. Esto tendría sentido desde una perspectiva evolutiva, para garantizar la supervivencia individual mediante un suministro adecuado de combustible como propósito principal y general. Sin embargo, sigue siendo un tema de debate si las ratas de camada reducida se mantienen sensibles o se vuelven resistentes a los efectos de la leptina (Andreoli et al., 2019). De cualquier manera, todo esto no explica aún el aumento en la expresión de NPY. Los animales SL-DPN21 mostraron también una mayor expresión de GHSR. Según la bibliografía, este cambio no estaría relacionado con una resistencia a la hormona (Cui et al., 2017), sino que estaría indicando una mayor señalización a través de éste (Yasrebi et al., 2016), y es lo que podría estar promoviendo la mayor expresión de NPY (Wang et al., 2002). Además, otros autores reportaron que la sobrealimentación neonatal potencia el efecto orexigénico de la grelina aumentando la sensibilidad del ARC a esta hormona en el período neonatal inmediato (Sominsky et al., 2017a) y al destete (Novelle et al., 2014). La producción gástrica de grelina está regulada diferencialmente por los macronutrientes (Sánchez et al., 2004). Los lípidos de cadena media presentes en la leche regulan la formación gástrica de acil-grelina que es la forma biológicamente activa de la hormona. Las fluctuaciones en la proporción de acil-grelina son jugadores importantes durante la transición lactancia-destete (Nishi et al., 2005) y podrían verse afectadas por la sobrealimentación neonatal. Esto indicaría que la sobrealimentación neonatal y el desarrollo temprano de la obesidad pueden implicar una respuesta hiperfágica mediada por el sistema ghrelina/GHSR/NPY.

El control hedónico de la ingesta está impulsado por el placer y los aspectos emocionales de la alimentación (Alonso-Alonso et al., 2015). Dentro de éste, el circuito dopaminérgico mesolímbico es fundamental para la elección y comportamientos motivados hacia los alimentos (Volkow et al., 2011). Los animales SL-DPN21 mostraron

mayores niveles de expresión de TH en ATV, lo que es consistente con la inmunotinción de la proteína TH que realizamos. Se han observado resultados similares en estudios que utilizan dieta rica en grasas y modelo de ratas propensas a la obesidad, donde este aumento de TH se ha relacionado con una mayor producción de DA (X.-F. Huang et al., 2005; Naef et al., 2008). Además, los animales SL-DPD21 mostraron mayores niveles de metilación en una región del promotor de *Th* relacionada con la unión de los factores de transcripción AP1 y AP2, ambos involucrados en la transcripción específica de la célula. Esta región es importante para la expresión de TH, pero existen otras secuencias downstream que también son esenciales para regular la transcripción de esta enzima [50]. Por esto creemos que los cambios de metilación observados en el promotor de *Th* en animales SL-DPN21 no fueron suficientes para reducir su expresión. Por otro lado, los animales SL-DPN21 también presentaron niveles de expresión disminuidos de DAT en ATV, que modula la concentración de DA intersináptica (Cragg & Rice, 2004). Los efectos de la sobrealimentación temprana sobre la expresión de DAT en ATV es posible que no involucre alteraciones en la metilación del promotor de *Slc6a3* o que la región estudiada no esté involucrada ya que no observamos diferencias en la metilación de su promotor. Estos resultados indican que el grupo SL-DPN21 podría haber aumentado la síntesis de DA y reducido la recaptación en ATV, lo que podría generar una mayor concentración de DA en el espacio sináptico. Esto podría motivar al animal a involucrarse en comportamientos de búsqueda de recompensas y consumo excesivo (Salvatore et al., 2016; Vucetic & Reyes, 2010). Como consecuencia de esto, los animales SL-DPN21 también presentaron mayores niveles de expresión de DRD2 en ATV, lo que va de acuerdo con lo observado en la IHQ de su proteína en el mismo núcleo. Este auto-receptor juega un papel clave en la regulación del sistema dopaminérgico al proporcionar una inhibición por retroalimentación que controla la activación y la síntesis celular, la liberación y la absorción de DA (De Jong et al., 2015). Por ende, una mayor expresión de DRD2 en ATV estaría actuando como un mecanismo compensatorio para regular los niveles de DA en el espacio pre-sináptico (Ford, 2014). Sumado a esta acción en ATV, el grupo SL-PND21 mostró una mayor expresión de DAT en NAcC junto con una disminución en la metilación de su promotor en el mismo núcleo. Esto podría ser un intento de aumentar la recaptación de DA para reducir la cantidad y la señalización del neuropéptido en el espacio post-sináptico (Cass et al., 1993; Schmitz et al., 2003). En cambio, no se detectaron modificaciones en la expresión génica en NAcSh de animales SL-DPN21. El papel de NAc en la regulación del apetito mediada por el circuito dopaminérgico mesolímbico ha sido ampliamente estudiado (Vucetic & Reyes, 2010), pero cada región de este núcleo tiene diferentes funciones en esta regulación que aún no se han dilucidado por completo. Algunos autores (Anderson &

Hearing, 2019; Bassareo et al., 2002; Fulton, 2010) sugieren que la señalización de DA en NAcC está relacionada con el desarrollo de comportamientos motivados mediante el aprendizaje y la predicción de valores motivacionales genéricos de los alimentos. Por el contrario, NAcSh es estimulado por la liberación de DA durante la exposición inicial a la novedad. Durante la lactancia, la estimulación del sistema de recompensa fue sostenida con el mismo alimento conocido, por lo tanto, se puede pensar que la región NAcC estuvo más activa en este proceso y por ende fue la región del núcleo que sufrió los efectos del tratamiento. A pesar de las alteraciones observadas en la expresión génica de los animales SL-DPN21, no se detectaron diferencias de comportamiento con respecto al grupo NL-DPN21, ya que el test SSS y la preferencia por una solución novedosa no se vieron afectadas. Esto estaría demostrando la eficiencia del control de la ingesta por recompensa que está desarrollando el sistema dopaminérgico en este test de sacarosa puntualmente.

II-Sobrealimentación neonatal y entorno ambiental en la adultez

Luego del destete, los animales fueron divididos en SE y EE y alimentados con comida balanceada, lo que modificó significativamente su entorno. Los animales de camada reducida fueron disminuyendo la diferencia de peso corporal con respecto al grupo de camada normal en el transcurso del experimento. Este cambio no fue acompañado de una reducción de ingesta por parte de estos animales. Sin embargo, en DPN90, los animales de camada reducida presentaban peso corporal y niveles metabólicos similares a los animales de camada normal. Si bien el peso de TAE se mantuvo algo elevado, se ve una clara tendencia hacia su normalización y esta diferencia parece no alterar el peso corporal total. En este caso no conocemos como cambiaron otros tejidos adiposos, y talvez el TAE necesita más tiempo que el resto de los parámetros para lograr regularizarse. En relación a estos resultados, algunos autores plantearon que los efectos de la camada reducida sobre el peso corporal y otros factores metabólicos son transitorios (Argente-Arizón et al., 2016; Morris et al., 2005). Sin embargo, otros estudios reportaron que el aumento de peso corporal y las alteraciones metabólicas observadas al destete en animales de camada reducida persiste hasta que los animales envejecen, siendo menos marcada la diferencia de peso al aumentar la edad (Argente-Arizón et al., 2016; Cone et al., 2013; De Souza Rodrigues Cunha et al., 2009; Habbout et al., 2012; Plagemann et al., 1992; Rodrigues et al., 2009, 2011). Estos últimos trabajos también relacionaron esta diferencia de peso con una mayor ingesta por parte de los animales de camada reducida durante todo el experimento. Creemos que esta diferencia en nuestros resultados de ingesta con respecto a los otros estudios puede explicar la diferencia en los resultados del peso corporal, y por supuesto, la

regularización del peso corporal en nuestros animales de camada reducida. Algunos autores analizaron el modelo de camada reducida hasta DPN60 (Dai et al., 2017; López et al., 2007; Stefanidis & Spencer, 2012) y, al igual que nosotros, no pudieron relacionar el sobrepeso de los animales con una mayor ingesta de alimentos. Por esto, ellos plantean la posibilidad de que otros factores de la regulación mantengan elevado el peso corporal. Es decir, el gasto energético u otros cambios metabólicos podrían verse afectados en ratas de camada reducida jóvenes. En este sentido, Stefanidis y Spencer (2012) vieron que animales de camada reducida juveniles, pero no adultos, presentaban menor gasto energético corporal. Esto indicaría un punto de quiebre del gasto energético durante la maduración de los animales de camada reducida. En nuestros animales, este punto de quiebre podría ser alrededor del DPN56, donde se puede ver que existen alteraciones en el peso corporal y la cantidad de ingesta en los animales de camada reducida. Podría ser que el crecimiento o el cambio de dieta lleven a estas ratas a un cambio de metabolismo de gasto energético, que explicaría la regularización del peso que vemos en nuestros animales. Por otro lado, el EE disminuyó el peso corporal en ambas camadas durante el experimento. Esta reducción de peso si se relacionó con una disminución de la ingesta de alimento en las primeras semanas de tratamiento y una reducción del TAE en DPN90. Este rápido efecto del EE sobre el peso corporal y la reducción del TAE había sido publicado previamente por otros autores (Cao et al., 2011; Peña et al., 2009; Wei et al., 2015; Zaias et al., 2008). Sin embargo, hay diferencias en la bibliografía sobre el efecto del EE sobre la ingesta y como se relaciona con el peso corporal. Zaias et al. (2008) y Fiala et al. (1977), también obtuvieron bajo peso corporal e ingesta en sus animales EE. En cambio, Cao et al. (2011), Mainardi et al. (2010) y Van de Weerd et al. (2010) observaron bajo peso corporal pero alta ingesta en animales EE, mientras que de León-Guerrero et al. (2022) no vio efecto alguno en el peso corporal o ingesta en sus animales EE. Además, el EE mantuvo niveles normales de glucosa y triglicéridos en suero, como había sido publicado previamente (Cao et al., 2011; Gergerlioglu et al., 2016). Si bien los animales EE mostraron diferencias significativas en los niveles de colesterol con respecto a los animales SE, ambos grupos mantuvieron los niveles dentro del rango fisiológico considerado normal (Georg J Krinke, 2000). Este último metabolito no ha sido muy estudiado en animales expuestos a EE, y los estudios disponibles para comparar son diferentes a nuestro modelo y controversiales entre ellos (de Souza et al., 2019; Wei et al., 2015). Por lo tanto, se requieren más estudios para dilucidar el efecto que puede tener el EE sobre este metabolito. La gran diversidad de modelos de EE y los estudios en diferentes especies hacen difícil la comparación con otros estudios. Esto demuestra que la forma en que se genere e implemente el EE es fundamental para la obtención de los resultados. Es importante remarcar que, el EE

logró reducir el peso corporal y del TAE de los animales SL-EE 90 a los niveles de los animales NL-SE 90.

En cuanto al control homeostático de la ingesta en adultos, la reducción de camada disminuyó la expresión de los neuropéptidos orexigénicos NPY, de manera independiente del ambiente, y AgRP, solo en animales de camada reducida con ambiente estándar. Esto muestra que los animales de camada reducida tienen disminuida la señal orexigénica. Estos resultados no se acompañan de cambios en la ingesta de los animales, pero, sí acompañan la disminución en el peso corporal. Por lo tanto, se puede pensar que la reducción de los neuropéptidos orexigénicos pueden estar en relación con la disminución del gasto energético como se planteó previamente. Sumado a estos resultados, los animales de camada reducida también regularizaron la expresión del receptor de la hormona orexigénica grelina, GHSR. En contraste con la activación del sistema GHSR/NPY observada en DPN21 y asociada con una mayor ingesta, en DPN90 los animales de camada reducida regularizaron este sistema y por eso ya no influye en la ingesta de alimentos. Otros autores también informaron que las influencias de la sobrealimentación neonatal en el sistema de grelina, incluido el aumento de la variación neuronal en respuesta a la acil-grelina exógena, no se mantuvieron en la edad adulta (Sominsky et al., 2017a). Por otro lado, el EE incrementó la expresión del neuropéptido anorexígeno POMC y los receptores Ob-Rb e IR de manera independiente de la camada, lo que explica el efecto de reducción de la ingesta y la consecuente pérdida de peso como efecto del EE. Además, el EE interactuó con la reducción de camada regularizando la expresión del neuropéptido orexigénico AgRP en animales SL-EE 90, lo que podría relacionarse con el pico de ingesta observado en este grupo en DPN90. También, disminuyó la expresión de GHSR solo en el grupo NL-EE 90, lo que va en línea con la reducción de la ingesta en dicho grupo, pero evidencia la interacción entre los factores que no permite reducir este receptor en SL-EE 90 también. En conjunto, estas alteraciones a nivel del ARC son el medio por el cual el EE ejerció su efecto de reducción del peso corporal, ingesta y TAE. Cao et al. (2013) también observó efectos del EE sobre la expresión de genes involucrados en la regulación de la ingesta en ARC. Sin embargo, ellos encontraron que ratones expuestos a un modelo de EE con ejercicio voluntario por 9 semanas mostraban aumentos en la expresión de NPY, AgRP, Ob-Rb e IR, sin cambios en la expresión de POMC y CART. Además, ellos relacionaron estos resultados con un aumento en la ingesta de dichos animales. Las diferencias observadas entre los resultados experimentales de nuevo pueden deberse tanto a la diferencia de especie como el modelo de EE implementado.

El estudio de la metilación del promotor de *Pomc* muestra que, a pesar de que la expresión fue normalizada en DPN90, el patrón de metilación del promotor en

animales de camada reducida difiere de acuerdo al ambiente. Estimamos que en animales de camada reducida en ambiente estándar la región promotora de *Pomc* con unión a Sp1, se mantuvo hipometilada para ser sensible a los niveles de leptina (Marco et al., 2014; Yang et al., 2009). Sumado a esto, la región potenciadora nPE1 pasó a estar hipermetilada para regularizar los niveles de expresión del gen. Por el contrario, los animales de camada reducida en ambiente enriquecido tienen hipermetilada la región del promotor de unión Sp1, lo que puede generar una respuesta reducida a leptina (Yang et al., 2009). Por lo tanto, podemos decir que los animales de camada reducida en ambiente estándar necesitan una buena regulación de los niveles de metilación del promotor y enhancer de *Pomc* para responder rápidamente a los cambios de leptina y prevenir el incremento de peso nuevamente. En cambio, los animales de camada reducida que estuvieron en ambiente enriquecido no requieren de tanto control epigenético de la expresión de *Pomc* e incluso no requieren alta sensibilidad a leptina para mantener un peso normal. Esto nos da un indicio de cómo podría estar regulándose la expresión de *Pomc* a nivel epigenético y la influencia que tienen la camada y el EE sobre esto, sin embargo, queda mucho más por estudiar.

Por otra parte, se analizó el circuito dopaminérgico mesolímbico como parte del control hedónico de la ingesta en animales adultos de diferentes camadas y ambientes. La reducción de camada no mostró efectos en la expresión de las moléculas estudiadas en ATV y NAcC en DPN90. Por lo tanto, las alteraciones observadas en estos núcleos en DPN21 se resolvieron, y la síntesis y recaptación de DA estarían restablecidas en estos núcleos en DPN90. Sin embargo, la reducción de camada generó mayor expresión de DAT en NAcSh, lo que podría producir a una mayor recaptación de DA en el espacio sináptico de dicho núcleo (Cass et al., 1993; Schmitz et al., 2003). La camada reducida también disminuyó los niveles de expresión de DRD1 en NAcSh, lo que podría evidenciar una señalización reducida de DA por este receptor en dicho núcleo. La reducción de la expresión de DRD1 en NAc también se ha observado en roedores alimentados crónicamente con una dieta rica en grasas (Alsio et al., 2010; Vucetic et al., 2012). Conjuntamente, estas alteraciones en NAcSh refuerzan lo mencionado anteriormente sobre la función de los núcleos de NAc. Como se dijo, NAcSh es estimulado por la liberación de DA durante la exposición inicial a la novedad (Anderson & Hearing, 2019; Bassareo et al., 2002; Fulton, 2010). Por lo tanto, el aumento de la expresión de DAT y, principalmente, la disminución de la expresión de DRD1 en NAcSh pueden regular la respuesta a nuevos estímulos. Esto va en línea con la menor ingesta de la solución novedosa y la mayor preferencia por la sacarosa observadas en la prueba SSS en el grupo SL-SE 90 (Lex & Hauber, 2008). Noschang (2014) también observó mayor preferencia por alimentos dulces en animales adultos de camada reducida, pero

no estudiaron las bases moleculares relacionadas. Por otro lado, hay estudios que vieron que las inyecciones intra-NAc de antagonistas de DRD1 amortiguan los efectos gratificantes (Aberman et al., 1998; Koch et al., 2000) y promueve la ingesta de comida palatable (Durst et al., 2018; Joshi et al., 2021). No se observaron diferencias en la prueba de CPP, probablemente porque el estímulo de la comida palatable no fue lo suficientemente fuerte como para cambiar la preferencia natural de los roedores por los espacios oscuros. Por otro lado, el EE tuvo varios efectos interesantes sobre el circuito dopaminérgico. Principalmente, incrementó la expresión de DRD1 y Ob-Rb en ATV, disminuyó la expresión de DRD1 y DAT en NAcC y de DRD2 en NAcSh. Además, EE interactuó con la camada reducida generando un incremento en la expresión de IR en el grupo NL-EE 90 pero no en el grupo SL-EE 90, e inversamente, un incremento en la expresión de GHSR en SL-EE 90 pero no en NL-EE 90 en ATV. También, regularizó la expresión de DRD1 y DAT en el grupo SL-EE 90 en NAcSh. Estas alteraciones sin duda aportan a la reducción de la ingesta que genera el EE, y también se relacionan con los resultados obtenidos en los test de conducta hacia los alimentos. No se sabe mucho acerca de la función de DRD1 en ATV, sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la activación de este receptor en ATV reduce los comportamientos relacionados con la ansiedad (Tong et al., 2022). Este resultado puede estar relacionado con el comportamiento menos ansioso observado en los animales EE en el desarrollo del test EPM, como se había visto previamente (H. Huang et al., 2021; Peña et al., 2009). Por otro lado, el incremento de los receptores hormonales en ATV puede estar involucrado con el efecto de reducción de la ingesta de EE, ya que se ha visto que la infusión de leptina en el ATV inhibe la actividad de las neuronas de dopamina, disminuye la ingesta de alimentos e induce disminuciones generalizadas en la sensibilidad a la recompensa en ratas (Figlewicz et al., 2004). De manera similar, la infusión de insulina en el ATV disminuye la ingesta de alimentos en ratas (Kenny, 2011). Además, la disminución en la expresión de DRD1 en NAcC y DRD2 en NAcSh se relacionan con una menor señalización de DA en estos núcleos. Por otro lado, la disminución en la expresión de DAT en NAcC puede dar una menor recaptación de DA en dicho núcleo. En conjunto, estos resultados muestran que animales de camada normal en EE presentan una menor la sensibilidad a la recompensa en ratas y una motivación reducida por la búsqueda de recompensa natural o por drogas (Carrette et al., 2022; Shen et al., 2016). Sin embargo, en animales de camada reducida en EE puede que esto no sea tan así por el aumento en la expresión de GHSR en ATV. Se ha visto que la grelina actúa en parte estimulando la transmisión de dopamina y, por lo tanto, aumenta la motivación por los alimentos o las drogas de abuso (Abizaid et al., 2006). Pese a esto, en el test de SSS, el EE logró que los animales de camada reducida presentaran una conducta normal a diferencia de

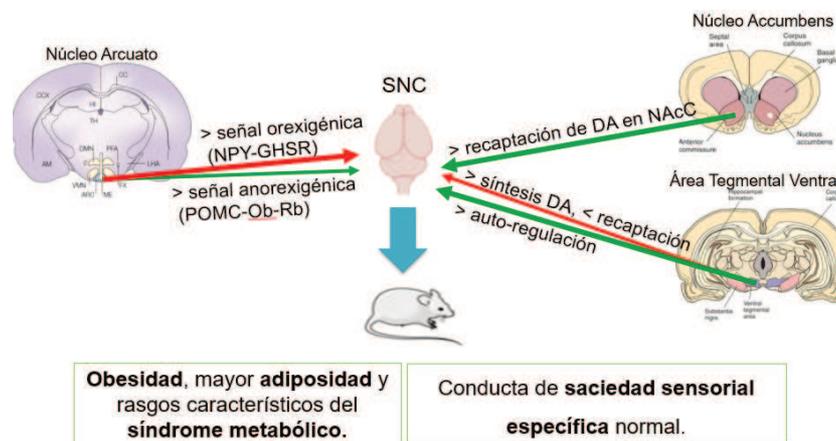
la camada reducida en SE. Creemos que la conducta diferencial observada en los animales de camada reducida en EE en el test CPP puede estar más bien relacionada con que estos animales tienen reducida la sensación de peligro y por lo tanto no necesitan esconderse en la oscuridad. Esto puede verse en el test de ansiedad, EMP, donde vemos de igual manera que los animales en EE ingresan menos a los brazos cerrados del laberinto. A nivel molecular, este resultado también se relaciona con el aumento de DRD1 en ATV como se mencionó previamente (Tong et al., 2022).

La regulación epigenética por metilación de los promotores de las moléculas del circuito dopaminérgico no ha sido tan estudiado como en los neuropéptidos del sistema homeostático. Creemos que la expresión de TH en ATV se normalizó en animales de camada reducida en SE por el aumento en la metilación de ambas regiones del promotor de *Th* que fueron estudiadas. Una de éstas se relaciona con una secuencia CREB que une al FT CRE, que ha sido definida como importante para la transcripción de *Th* tanto a nivel basal como inducida en cultivos celulares (Cambi et al., 1989; Ghee et al., 1998; Lewis-Tuffin et al., 2004). En cambio, los animales de camada reducida en EE no requirieron cambios en la metilación para mantener una expresión normal de TH en ATV. La regulación de la expresión de *Drd1* por mecanismos epigenéticos, no ha sido bien descrita. A pesar de que analizamos los niveles de metilación de un sitio de restricción en la isla CpG en el promotor de *Drd1*, no encontramos alteraciones en el grupo SL-SE 90. Por tanto, suponemos que este mecanismo de regulación, o al menos esta región promotora, no está implicada en el control de la expresión génica asociada a la camada reducida. La expresión génica de DAT no se puede asociar con los cambios de niveles de metilación observados en el promotor *Slc6a3* en las regiones estudiadas. Esto podría indicar que la regulación epigenética del promotor *Slc6a3* puede no seguir la vía canónica, como han visto otros autores (Cortes et al., 2022; Wan et al., 2015). Sin embargo, se necesitan más estudios para entender y determinar si los cambios de metilación que hemos visto en los animales de camada reducida y ambiente enriquecido son marcadores genéticos a largo plazo como consecuencia del tratamiento (Raynal et al., 2012).

9- Conclusiones

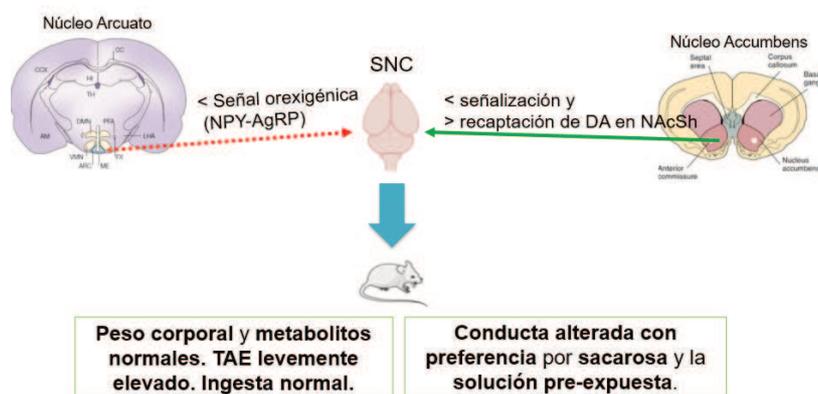
Sobre lo expuesto en este trabajo de tesis podemos concluir que:

- La sobrealimentación neonatal inducida por la reducción de camada genera obesidad, mayor tejido adiposo epididimal y rasgos característicos del síndrome metabólico al destete. Estas características promueven una señal anorexigénica que intenta regularizar el balance energético por medio del sistema leptina/Ob-Rb/POMC. Este proceso involucra mecanismos epigenéticos que regulan los niveles de metilación en sitios del promotor de *Pomc* claves para la regulación de su expresión por leptina. Sin embargo, hay otra señal orexigénica muy potente mediada por el sistema grelina/GHSR/NPY que está manteniendo el balance energético positivo. Por otro lado, los animales de camada reducida tienen una mayor expresión de TH y expresión de DAT reducida en ATV, lo que aumentaría los niveles inter-sinápticos de DA. En respuesta a esto, la expresión de DRD2, que regula la síntesis de DA, está aumentada en ATV, y también la expresión de DAT, que elimina la DA del espacio sináptico, está aumentada en NAcC. Estos intentos de regulación de la síntesis y liberación de DA parecen haber sido efectivos ya que los animales de camada reducida presentan un comportamiento normal hacia los alimentos.

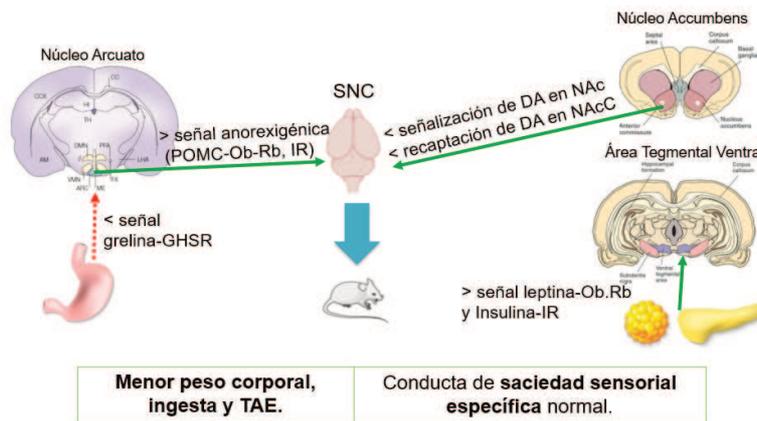


- Los efectos metabólicos de la camada reducida fueron temporales ya que, en la edad adulta, los animales presentan peso corporal, ingesta y metabolitos en suero normales. Solo el peso del tejido adiposo epididimal se mantiene un poco aumentado con una tendencia a su reducción. Además, los animales adultos presentan una señal orexigénica disminuida y expresión normal de GHSR. Por lo tanto, la señal

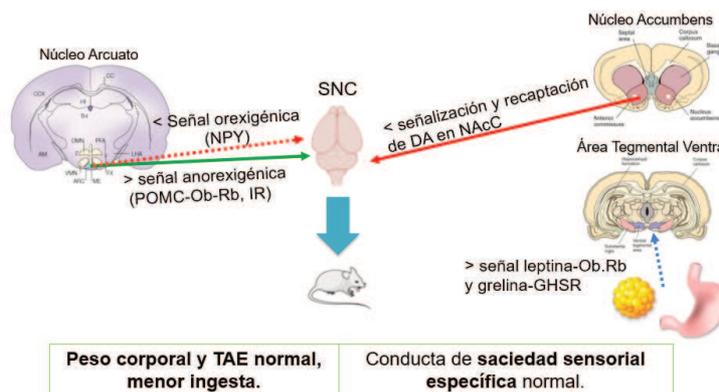
orexigénica potente que mantenía la obesidad en DPN21, no actúa en los animales de DPN90 justificando la normalización del peso corporal. Sumado a esto y como una marca de prevención, el promotor de *Pomc* presenta alteraciones en los niveles de metilación que le permiten responder rápidamente a la señal de leptina y prevenir el incremento de peso corporal. En cambio, el circuito dopaminérgico fue afectado a largo plazo de manera negativa. Las alteraciones observadas en DPN21 que afectaban los núcleos ATV y NAcC se restablecieron. Pero, los animales adultos presentaron disminución de la expresión de DRD1 y mayor expresión de DAT en NAcSh. Estas alteraciones pueden vincularse con la menor ingesta de la solución nueva no palatable y mayor preferencia por la sacarosa que presentaron los animales en la prueba SSS. Esto demuestra que los animales adultos de camada reducida son propensos a una mayor ingesta de alimentos motivada por la recompensa.



- El ambiente enriquecido incorporado en los animales de camada normal luego del destete y por 10 semanas disminuye el peso corporal y del peso del tejido adiposo epididimal por medio de la reducción de la ingesta. Estos cambios metabólicos son posibles porque el ambiente enriquecido afecta el control homeostático de la ingesta, aumentando la señal anorexígena por medio del aumento del neuropéptido POMC y los receptores hormonales Ob-Rb y IR en el núcleo arcuato. También, afecta el circuito dopaminérgico mesolímbico, aumentando los receptores hormonales que reducen la activación de neuronas dopaminérgicas y reducen la ingesta. Además, reduce los receptores de DA en el núcleo accumbens promoviendo una menor sensibilidad a la recompensa y una motivación reducida por la búsqueda de recompensa natural o por drogas.



- El ambiente enriquecido logró que los animales de camada reducida presenten un peso corporal y de tejido adiposo normal. Esta regularización se dio por la disminución de la ingesta que fue promovida por la señal anorexígena del control homeostático de la ingesta. Sin embargo, la ingesta de estos animales aumentó en el último tramo del experimento, por lo que sería necesario continuar el tratamiento por más tiempo para ver si estos cambios son estables en el tiempo. Por otro lado, el ambiente enriquecido afectó positivamente al circuito dopaminérgico mesolímbico de los animales de camada reducida. Regularizó las alteraciones del NAcSh y normalizó el comportamiento hacia los alimentos, que habían sido alterados en animales de camada reducida en ambiente estándar.



Entonces, los resultados presentados demuestran que la reducción de la camada es un modelo adecuado para generar una obesidad temprana. Sin embargo, esta condición no se mantuvo hasta la adultez en nuestros animales alimentados con comida balanceada. Igualmente, este tratamiento si generó efectos en el circuito dopaminérgico a largo plazo promoviendo la preferencia por la ingesta de sacarosa. Esto demuestra la

importancia de controlar el tamaño de las camadas en los bioterio para todo tipo de experimentos. Por otra parte, se puede decir que, el ambiente enriquecido fue efectivo para restablecer las alteraciones ocasionadas por la camada reducida en los animales adultos. Además, reduce el peso corporal y tiene efectos positivos sobre el circuito dopaminérgico mesolímbico en animales de camada normal. Hay que tener en cuenta que la forma en que se genere e implemente el ambiente enriquecido es fundamental para ver los efectos de este tratamiento. Pero, con estos resultados podemos decir que la hipótesis planteada en esta tesis ha sido confirmada efectivamente. Además, se demuestra la vulnerabilidad de un periodo crítico como es la lactancia, y se proporciona evidencia de los efectos que la alimentación y el entorno neonatal pueden tener sobre la salud a corto y largo plazo.

10- Bibliografía

- Aberman, J. E., Ward, S. J., & Salamone, J. D. (1998). Effects of dopamine antagonists and accumbens dopamine depletions on time-constrained progressive-ratio performance. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *61*(4), 341–348. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(98\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(98)00112-9)
- Abizaid, A., Liu, Z. W., Andrews, Z. B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Sleeman, M. W., Picciotto, M. R., Tschöp, M. H., Gao, X. B., & Horvath, T. L. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(12), 3229–3239. <https://doi.org/10.1172/JCI29867>
- Agosti, M., Tandoi, F., Morlacchi, L., & Bossi, A. (2017). Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *La Pediatria Medica e Chirurgica : Medical and Surgical Pediatrics*, *39*(2), 157. <https://doi.org/10.4081/PMC.2017.157>
- Alonso-Alonso, M., Woods, S. C., Pelchat, M., Grigson, P. S., Stice, E., Farooqi, S., Khoo, C. S., Mattes, R. D., & Beauchamp, G. K. (2015). Food reward system: current perspectives and future research needs. *Nutrition Reviews*, *73*(5), 296–307. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv002>
- Alsio, J., Olszewski, P. K., Norback, A. H., Gunnarsson, Z. E. A., Levine, A. S., Pickering, C., & Schioth, H. B. (2010). Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience*, *171*(3), 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.046>
- Anderson, E., & Hearing, M. (2019). Neural Circuit Plasticity in Addiction. *Neural Mechanisms of Addiction*, 35–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812202-0.00004-X>
- Andreoli, M. F., Donato, J., Cakir, I., & Perello, M. (2019). Leptin resensitisation: A reversion of leptin-resistant states. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 241, Issue 3, pp. R81–R96). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0606>
- Andreoli, M. F., Stoker, C., Rossetti, M. F., Alzamendi, A., Castrogiovanni, D., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2015). Withdrawal of dietary phytoestrogens in adult male rats affects hypothalamic regulation of food intake, induces obesity and alters glucose metabolism. *Mol Cell Endocrinol*, *401*, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.002>
- Andreoli, M. F., Stoker, C., Rossetti, M. F., Lazzarino, G. P., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2016). Dietary withdrawal of phytoestrogens resulted in higher gene expression of 3-beta-HSD and ARO but lower 5-alpha-R-1 in male rats. *Nutrition Research*, *36*(9), 1004–1012. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.05.003>
- Argente-Arizona, P., Ros, P., Díaz, F., Fuente-Martin, E., Castro-González, D., Sánchez-Garrido, M. Á., Barrios, V., Tena-Sempere, M., Argente, J., & Chowen, J. A. (2016). Age and sex dependent effects of early overnutrition on metabolic parameters and the role of neonatal androgens. *Biology of Sex Differences*, *7*, 26. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0079-5>
- Attwood, J. T., Yung, R. L., & Richardson, B. C. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *59*(2), 241–257. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8420-z>
- Baik, J.-H. (2013). Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*, 152. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00152>
- Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy

balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*, 3(8), 589–600.
<https://doi.org/10.1038/nrg862>

- Bassareo, V., De Luca, M. A., & Di Chiara, G. (2002). Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4709–4719.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-11-04709.2002>
- Bei, F., Jia, J., Jia, Y.-Q., Sun, J.-H., Liang, F., Yu, Z.-Y., & Cai, W. (2015). Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), 96.
<https://doi.org/10.1186/s12944-015-0094-2>
- Bell, B. B., Harlan, S. M., Morgan, D. A., Guo, D.-F., & Rahmouni, K. (2018). Differential contribution of POMC and AgRP neurons to the regulation of regional autonomic nerve activity by leptin. *Molecular Metabolism*, 8, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2017.12.006>
- Bello, E. P., Mateo, Y., Gelman, D. M., Noaín, D., Shin, J. H., Low, M. J., Alvarez, V. A., Lovinger, D. M., & Rubinstein, M. (2011). Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nature Neuroscience*, 14(8), 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nn.2862>
- Bommarito, P. A., & Fry, R. C. (2018). The role of DNA methylation in gene regulation. In *Toxicopigenetics: Core Principles and Applications* (pp. 127–151). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812433-8.00005-8>
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(11), 2797–2805.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004>
- Breier, B. H., Vickers, M. H., Ikenasio, B. A., Chan, K. Y., & Wong, W. P. S. (2001). Fetal programming of appetite and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 185(1–2), 73–79. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00634-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00634-7)
- Cabral, A., Valdivia, S., Fernandez, G., Reynaldo, M., & Perello, M. (2014). Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central Ghrelin: Critical role of brain accessibility. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(8), 542–554. <https://doi.org/10.1111/jne.12168>
- Cambi, F., Fung, B., & Chikaraishi, D. (1989). 5' flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase. *Journal of Neurochemistry*, 53(5), 1656–1659. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1989.TB08567.X>
- Cao, L., Choi, E. Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., & During, M. J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metabolism*, 14(3), 324–338.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.020>
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., & During, M. J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature Genetics*, 36(8), 827–835. <https://doi.org/10.1038/NG1395>
- Cao, L., Liu, X., Lin, E. D., Wang, C., Choi, E. Y., Lin, B., & During, M. J. (2013). *NIH Public Access*. 142(1), 52–64.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.029.Environmental>
- Carrette, L. L. G., Corral, C., Boomhower, B., Brennan, M., Crook, C., Ortez, C., Shankar, K., Simpson, S., Maturin, L., Solberg Woods, L. C., Palmer, A. A., de Guglielmo, G., & George, O. (2022). Leptin Protects Against the Development and

- Expression of Cocaine Addiction-Like Behavior in Heterogeneous Stock Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2022.832899/FULL>
- Carvalho, A. L. O., Ferri, B. G., de Sousa, F. A. L., Vilela, F. C., & Giusti-Paiva, A. (2016). Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 53, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.07.005>
- Cass, W. A., Zahniser, N. R., Flach, K. A., & Gerhardt, G. A. (1993). Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2269–2278. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1993.TB07469.X>
- Cikos, S., Bukovska, A. and Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. In *BMC Mol Biol*.
- Conceição, E. P. S., Carvalho, J. C., Manhães, A. C., Guarda, D. S., Figueiredo, M. S., Quitete, F. T., Oliveira, E., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2016). Effect of Early Overfeeding on Palatable Food Preference and Brain Dopaminergic Reward System at Adulthood: Role of Calcium Supplementation. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(5). <https://doi.org/10.1111/jne.12380>
- Cone, J. J., Chartoff, E. H., Potter, D. N., Ebner, S. R., & Roitman, M. F. (2013). Prolonged High Fat Diet Reduces Dopamine Reuptake without Altering DAT Gene Expression. *PLoS ONE*, 8(3), e58251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058251>
- Cortes, L. R., Cisternas, C. D., Cabahug, I. N. K. V., Mason, D., Ramlall, E. K., Castillo-Ruiz, A., & Forger, N. G. (2022). DNA Methylation and Demethylation Underlie the Sex Difference in Estrogen Receptor Alpha in the Arcuate Nucleus. *Neuroendocrinology*, 112(7), 636–648. <https://doi.org/10.1159/000519671>
- Coupé, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., & Parnet, P. (2010). Nutritional Programming Affects Hypothalamic Organization and Early Response to Leptin. *Endocrinology*, 151(2), 702–713. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0893>
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Cragg, S. J., & Greenfield, S. A. (1997). Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5738–5746. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-15-05738.1997>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2004). DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
- Cui, H., López, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 13, Issue 6, pp. 338–351). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
- Dai, Y., Zhou, N., Yang, F., Zhou, S., Sha, L., Wang, J., & Li, X. (2017). Effects of postnatal overfeeding and fish oil diet on energy expenditure in rats. *Nature Publishing Group*, 83. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.207>
- Dawoud Al-Bader, M., & Ali Al-Sarraf, H. (2005). Housekeeping gene expression

- during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR. *Developmental Brain Research*, 156(1), 38–45.
<https://doi.org/10.1016/J.DEVBRAINRES.2005.01.010>
- De Jong, J. W., Roelofs, T. J. M., Mol, F. M. U., Hillen, A. E. J., Meijboom, K. E., Luijendijk, M. C. M., Van Der Eerden, H. A. M., Garner, K. M., Vanderschuren, L. J. M. J., & Adan, R. A. H. (2015). Reducing Ventral Tegmental Dopamine D2 Receptor Expression Selectively Boosts Incentive Motivation. *Neuropsychopharmacology*, 40(9), 2085–2095.
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.60>
- de León-Guerrero, S. D., Salazar-León, J., Meza-Sosa, K. F., Valle-Garcia, D., Aguilar-León, D., Pedraza-Alva, G., & Pérez-Martínez, L. (2022). An enriched environment re-establishes metabolic homeostasis by reducing obesity-induced inflammation. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 15(6).
<https://doi.org/10.1242/DMM.048936/274225/AM/AN-ENRICHED-ENVIRONMENT-REESTABLISHES-METABOLIC>
- de Souza, R. M., de Souza, L., Machado, A. E., de Bem Alves, A. C., Rodrigues, F. S., Aguiar, A. S., dos Santos, A. R. S., de Bem, A. F., & Moreira, E. L. G. (2019). Behavioural, metabolic and neurochemical effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. *Behavioural Brain Research*, 359, 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.09.022>
- De Souza Rodrigues Cunha, A. C., Pereira, R. O., dos Santos Pereira, M. J., de Melo Soares, V., Martins, M. R., Teixeira Teixeira, M., Souza, É. P. G., & Moura, A. S. (2009). Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion - the role of GLUT-2. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(6), 435–442.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.002>
- Dimitsantos, E., Escorihuela, R. M., Fuentes, S., Armario, A., & Nadal, R. (2007). Litter size affects emotionality in adult male rats. *Physiology and Behavior*, 92(4), 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.066>
- Dodd, G. T., & Tiganis, T. (2017). Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(10).
<https://doi.org/10.1111/JNE.12513>
- Durst, M., Könczöl, K., Balázs, T., Eyre, M. D., & Tóth, Z. E. (2018). Reward-representing D1-type neurons in the medial shell of the accumbens nucleus regulate palatable food intake. *International Journal of Obesity* 2018 43:4, 43(4), 917–927. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0133-y>
- Ellsworth, L., Harman, E., Padmanabhan, V., & Gregg, B. (2018). Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(2), R23–R42. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0780>
- Enes-Marques, S., & Giusti-Paiva, A. (2018). Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *The Journal of Physiological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0594-8>
- Erlanson-Albertsson, C. (2005). How Palatable Food Disrupts Appetite Regulation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 97(2), 61–73.
https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_179.x
- Fiala, B., Snow, F. M., & Greenough, W. T. (1977). “Impoverished” rats weigh more than “Enriched” rats because they eat more. *Developmental Psychobiology*, 10(6), 537–541. <https://doi.org/10.1002/dev.420100607>
- Figlewicz, D. P., Bennett, J., Evans, S. B., Kaiyala, K., Sipols, A. J., & Benoit, S. C. (2004). Intraventricular Insulin and Leptin Reverse Place Preference Conditioned

- With High-Fat Diet in Rats. *Behavioral Neuroscience*, 118(3), 479–487.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.3.479>
- Figlewicz, D. P., & Sipols, A. J. (2010). ENERGY REGULATORY SIGNALS AND FOOD REWARD. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 97(1), 15.
<https://doi.org/10.1016/J.PBB.2010.03.002>
- Fiorotto, M. L., Burrin, D. G., Perez, M., & Reeds, P. J. (1991). Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260(6), R1104–R1113. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.6.R1104>
- Fleming, T. P., Watkins, A. J., Velazquez, M. A., Mathers, J. C., Prentice, A. M., Stephenson, J., Barker, M., Saffery, R., Yajnik, C. S., Eckert, J. J., Hanson, M. A., Forrester, T., Gluckman, P. D., & Godfrey, K. M. (2018). Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *Lancet (London, England)*, 391(10132), 1842–1852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30312-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30312-X)
- Ford, C. P. (2014). The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*, 282, 13–22.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.01.025>
- Fulton, S. (2010). Appetite and reward. In *Frontiers in Neuroendocrinology*.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.10.003>
- Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R. P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E. N., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (2006). Leptin Regulation of the Mesoaccumbens Dopamine Pathway. *Neuron*, 51(6), 811–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.006>
- Georg J Krinke. (2000). *The Laboratory Rat* (Elsevier Ltd. (ed.); First edit).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-426400-7.X5037-7>
- Gergerlioglu, H. S., Oz, M., Demir, E. A., Nurullahoglu-Atalik, K. E., & Yerlikaya, F. H. (2016). Environmental enrichment reverses cognitive impairments provoked by Western diet in rats: Role of corticosteroid receptors. *Life Sciences*, 148, 279–285.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.011>
- Ghee, M., Baker, H., Miller, J. C., & Ziff, E. B. (1998). AP-1, CREB and CBP transcription factors differentially regulate the tyrosine hydroxylase gene. *Molecular Brain Research*, 55(1), 101–114. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00370-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00370-7)
- Gonzales, R. A., Job, M. O., & Doyon, W. M. (2004). The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacology & Therapeutics*, 103(2), 121–146.
<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2004.06.002>
- Habbout, A., Delemasure, S., Goirand, F., Guillard, J. C., Chabod, F., Sediki, M., Rochette, L., & Vergely, C. (2012). Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie*, 94(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.023>
- Habbout, A., Li, N., Rochette, L., & Vergely, C. (2013). Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *Journal of Nutrition*, 143(5), 553–562.
<https://doi.org/10.3945/jn.112.172825>
- Heidel, E., Plagemann, A., & Davidowa, H. (1999). Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *NeuroReport*, 10(9), 1827–1831. <https://doi.org/10.1097/00001756-199906230-00005>

- Higuchi, H., Hasegawa, A., & Yamaguchi, T. (2005). Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: transcriptional regulation of neuropeptide Y gene by leptin and its effect on feeding. *Journal of Pharmacological Sciences*, *98*(3), 225–231. <https://doi.org/10.1254/JPHS.FMJ05001X6>
- Hommel, J. D., Trinko, R., Sears, R. M., Georgescu, D., Liu, Z. W., Gao, X. B., Thurmon, J. J., Marinelli, M., & DiLeone, R. J. (2006). Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. *Neuron*, *51*(6), 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.023>
- Huang, H., Wang, Q., Guan, X., Zhang, X., Zhang, Y., Cao, J., & Li, X. (2021). Effects of enriched environment on depression and anxiety-like behavior induced by early life stress: A comparison between different periods. *Behavioural Brain Research*, *411*, 113389. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2021.113389>
- Huang, X.-F., Yu, Y., Zavitsanou, K., Han, M., & Storlien, L. (2005). Differential expression of dopamine D2 and D4 receptor and tyrosine hydroxylase mRNA in mice prone, or resistant, to chronic high-fat diet-induced obesity. *Molecular Brain Research*, *135*(1–2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.013>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC) - Secretaría de Gobierno de Salud de Argentina. (2019). *4º Encuesta Nacional de Factores de Riesgo* (4ta ed.).
- Joshi, A., Kool, T., Diepenbroek, C., Koekkoek, L. L., Eggels, L., Kalsbeek, A., Mul, J. D., Barrot, M., & la Fleur, S. E. (2021). Dopamine D1 receptor signalling in the lateral shell of the nucleus accumbens controls dietary fat intake in male rats. *Appetite*, *167*, 105597. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2021.105597>
- Kenny, P. J. (2011). Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(11), 638–651. <https://doi.org/10.1038/nrn3105>
- Khazipov, R., Zaynutdinova, D., Ogievetsky, E., Valeeva, G., Mitrukhnina, O., Manent, J.-B., & Represa, A. (2015). Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*, 161. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
- Kinzig, K. P., Scott, K. A., Hyun, J., Bi, S., & Moran, T. H. (2005). Altered Hypothalamic Signaling and Responses to Food Deprivation in Rats Fed a Low-Carbohydrate Diet. *Obesity Research*, *13*(10), 1672–1682. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.205>
- Koch, M., Schmid, A., & Schnitzler, H. U. (2000). Role of nucleus accumbens dopamine D1 and D2 receptors in instrumental and Pavlovian paradigms of conditioned reward. *Psychopharmacology*, *152*(1), 67–73. <https://doi.org/10.1007/S002130000505>
- Kong, K. L., Feda, D. M., Eiden, R. D., & Epstein, L. H. (2015). Origins of food reinforcement in infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *101*(3), 515–522. <https://doi.org/10.3945/AJCN.114.093237>
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., & Roeper, J. (2008). Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron*, *57*(5), 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.022>
- Larhammar, D., Ericsson, A., & Persson, H. (1987). Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(7), 2068–2072. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.2068>
- Lazzarino, G. P., Andreoli, M. F., Rossetti, M. F., Stoker, C., Tschopp, M. V., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2017). Cafeteria diet differentially alters the expression of feeding-related genes through DNA methylation mechanisms in individual

- hypothalamic nuclei. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 450, 113–125.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.005>
- Lewis-Tuffin, L. J., Quinn, P. G., & Chikaraishi, D. M. (2004). Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(3), 536–547. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2003.10.010>
- Lex, A., & Hauber, W. (2008). Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer. *Learning & Memory*, 15(7), 483. <https://doi.org/10.1101/LM.978708>
- Li, G., Zhang, W., Baker, M. S., Laritsky, E., Mattan-Hung, N., Yu, D., Kunde-Ramamoorthy, G., Simerly, R. B., Chen, R., Shen, L., & Waterland, R. A. (2014). Major epigenetic development distinguishing neuronal and non-neuronal cells occurs postnatally in the murine hypothalamus. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1579–1590. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt548>
- Lisboa, P. C., Miranda, R. A., Souza, L. L., & Moura, E. G. (2021). Can breastfeeding affect the rest of our life? *Neuropharmacology*, 200(October), 108821. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108821>
- López, M., Seoane, L. M., Tovar, S., García, M. C., Nogueiras, R., Diéguez, C., & Señarís, R. M. (2005). A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia*, 48(1), 140–148. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1596-z>
- López, M., Tovar, S., Vázquez, M. J., Nogueiras, R., Seoane, L. M., García, M., Señarís, R. M., & Diéguez, C. (2007). Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *International Journal of Obesity*, 31(2), 371–377. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803425>
- Maggos, C. E., Spangler, R., Zhou, Y., Schlussman, S. D., Ho, A., & Kreek, M. J. (1997). Quantitation of dopamine transporter mRNA in the rat brain: mapping, effects of “binge” cocaine administration and withdrawal. *Synapse (New York, N.Y.)*, 26(1), 55–61. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199705\)26:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199705)26:1)
- Mainardi, M., Scabia, G., Vottari, T., Santini, F., Pinchera, A., Maffei, L., Pizzorusso, T., & Maffei, M. (2010). A sensitive period for environmental regulation of eating behavior and leptin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), 16673–16678. https://doi.org/10.1073/PNAS.0911832107/SUPPL_FILE/PNAS.200911832SI.PDF
- Marco, A., Kisliouk, T., Tabachnik, T., Meiri, N., & Weller, A. (2014). Overweight and CpG methylation of the Pomc promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not “reprogrammed” by regular chow diet in rats. *FASEB J.* <https://doi.org/10.1096/fj.14-255620>
- Marco, A., Schroeder, M., & Weller, A. (2012). Feeding and reward: Ontogenetic changes in an animal model of obesity. *Neuropharmacology*, 62(8), 2447–2454. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.019>
- Marousez, L., Lesage, J., & Eberlé, D. (2019). Epigenetics: Linking early postnatal nutrition to obesity programming? *Nutrients*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/nu11122966>
- Mebel, D. M., Wong, J. C. Y., Dong, Y. J., & Borgland, S. L. (2012). Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. *European Journal of Neuroscience*, 36(3),

2336–2346. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x>

- Meye, F. J., & Adan, R. A. H. (2014). Feelings about food: The ventral tegmental area in food reward and emotional eating. *Trends in Pharmacological Sciences*, *35*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.11.003>
- Mohammed, A. H., Zhu, S. W., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Diamond, M. C., Eriksson, P. S., & Bogdanovic, N. (2002). Environmental enrichment and the brain. *Progress in Brain Research*, *138*, 109–133. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)38074-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)38074-9)
- Money, K. M., & Stanwood, G. D. (2013). Developmental origins of brain disorders: Roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(DEC), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00260>
- Morris, M. J., Velkoska, E., & Cole, T. J. (2005). Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. *Experimental Physiology*, *90*(5), 697–702. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.030783>
- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(6), 367–378. <https://doi.org/10.1038/nrn3745>
- Mozeš, Š., Šefčíková, Z., & Raček, L. (2014). Long-term effect of altered nutrition induced by litter size manipulation and cross-fostering in suckling male rats on development of obesity risk and health complications. *European Journal of Nutrition*, *53*(5), 1273–1280. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0630-7>
- Muraoka, O., Xu, B., Tsurumaki, T., Akira, S., Yamaguchi, T., & Higuchi, H. (2003). Leptin-induced transactivation of NPY gene promoter mediated by JAK1, JAK2 and STAT3 in the neural cell lines. *Neurochemistry International*, *42*(7), 591–601. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00160-2)
- Naef, L., Srivastava, L., Gratton, A., Hendrickson, H., Owens, S. M., & Walker, C. D. (2008). Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology*, *197*(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/S00213-007-1008-4>
- Naleid, A. M., Grace, M. K., Cummings, D. E., & Levine, A. S. (2005). Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides*, *26*(11), 2274–2279. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.025>
- Nicolaidis, S. (2019). Environment and obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *100S*. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2019.07.006>
- Nishi, Y., Hiejima, H., Mifune, H., Sato, T., Kangawa, K., & Kojima, M. (2005). Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology*, *146*(6), 2709–2715. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0645>
- Noschang, C. (2014). Neonatal Overfeeding Induced by Reducing the Litter Size Leads to an Obese Phenotype and Increases Preference for Sweet Food in Adult Male Rats. *British Journal of Medicine and Medical Research*, *4*(4), 957–968. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2014/5161>
- Novelle, M. G., & Diéguez, C. (2018). Food Addiction and Binge Eating: Lessons Learned from Animal Models. *Nutrients*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/NU10010071>
- Novelle, M. G., Vázquez, M. J., Martinello, K. D., Sanchez-Garrido, M. A., Tena-

- Sempere, M., & Diéguez, C. (2014). Neonatal events, such as androgenization and postnatal overfeeding, modify the response to ghrelin. *Scientific Reports*, *4*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep04855>
- Ong, Z. Y., Gugusheff, J. R., & Muhlhausler, B. S. (2012). Perinatal overnutrition and the programming of food preferences: pathways and mechanisms. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, *3*(5), 299–308. <https://doi.org/10.1017/S204017441200030X>
- Ong, Z. Y., & Muhlhausler, B. S. (2011). Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J*, *25*(7), 2167–2179. <https://doi.org/10.1096/fj.10-178392>
- Paccola, C. C., Resende, C. G., Stumpp, T., Miraglia, S. M., Cipriano, I., Paccola, C. C., Resende, C. G., Stumpp, T., Miraglia, S. M., & Cipriano, I. (2018). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction (AR)*, *10*(4), 677–683.
- Palkovits, M. Brownstein, M. J. (1988). Maps and guide to microdissection of the rat brain. *Elsevier*.
- Palmiter, R. D. (2007). Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends in Neurosciences*, *30*(8), 375–381. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.06.004>
- Pan, H., Guo, J., & Su, Z. (2014). Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiology and Behavior*, *130*, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.003>
- Parra-Vargas, M., Ramon-Krauel, M., Lerin, C., & Jimenez-Chillaron, J. C. (2020). Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents. *Cell Metabolism*, *32*(3), 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.014>
- Paxinos, G., Ashwell, K. W. S., & Törk, I. (1994). *Atlas of the developing rat nervous system*. Academic Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates. In Elsevier (Ed.), *Brain: Vol. Second* (Issue 11). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90017-8)
- Peña, Y., Prunell, M., Rotllant, D., Armario, A., & Escorihuela, R. M. (2009). Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(9), 1390–1404. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2009.04.019>
- Perelló, M., & Zigman, J. M. (2012). The role of ghrelin in reward-based eating. *Biological Psychiatry*, *72*(5), 347. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2012.02.016>
- Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., & Dudenhausen, J. W. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *Journal of Physiology*, *587*(20), 4963–4976. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176156>
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Waas, T., Melchior, K., Ziska, T., Rohde, W., & Dörner, G. (1999). Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *11*(7), 541–546.

- Plagemann, A., Harder, T., Schellong, K., Schulz, S., & Stupin, J. H. (2012). Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *26*(5), 641–653. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2012.03.008>
- Plagemann, A., Heidrich, I., Gotz, F., Rohde, W., & Dorner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol*, *99*(3), 154–158. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211159>
- Portella, A. K., Silveira, P. P., Laureano, D. P., Cardoso, S., Bittencourt, V., Noschang, C., Werlang, I., Fontella, F. U., Dalmaz, C., & Goldani, M. Z. (2015). Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. *Behavioural Brain Research*, *278*, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.033>
- Raynal, N. J. M., Si, J., Taby, R. F., Gharibyan, V., Ahmed, S., Jelinek, J., Estécio, M. R. H., & Issa, J. P. J. (2012). DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer Research*, *72*(5), 1170–1181. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3248>
- Reichelt, A. C., Morris, M. J., & Westbrook, R. F. (2014). Cafeteria diet impairs expression of sensory-specific satiety and stimulus-outcome learning. *Front Psychol*, *5*, 852. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00852>
- Rodrigues, A. L., De Moura, E. G., Fonseca Passos, M. C., Potente Dutra, S. C., & Lisboa, P. C. (2009). Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *Journal of Physiology*, *587*(11), 2647–2661. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169045>
- Rodrigues, A. L., de Moura, E. G., Passos, M. C. F., Trevenzoli, I. H., da Conceição, E. P. S., Bonono, I. T., Neto, J. F. N., & Lisboa, P. C. (2011). Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *22*(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.013>
- Rossetti, M. F., Schumacher, R., Gastiazoro, M. P., Lazzarino, G. P., Andreoli, M. F., Stoker, C., Varayoud, J., & Ramos, J. G. (2019). Epigenetic Dysregulation of Dopaminergic System by Maternal Cafeteria Diet During Early Postnatal Development. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.09.016>
- Rossetti, M. F., Varayoud, J., Moreno-Piovano, G. S., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2015). Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state of the steroid 5 α -reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *412*, 330–338. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.05.024>
- Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metabolism*, *27*(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021>
- Roth, T. L. (2013). Epigenetic mechanisms in the development of behavior: advances, challenges, and future promises of a new field. *Development and Psychopathology*, *25*(4 Pt 2), 1279–1291. <https://doi.org/10.1017/S0954579413000618>
- Salvatore, M. F., Calipari, E. S., & Jones, S. R. (2016). Regulation of Tyrosine Hydroxylase Expression and Phosphorylation in Dopamine Transporter-Deficient Mice. *ACS Chemical Neuroscience*, *7*(7), 941–951. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00064>

- Sánchez, J., Oliver, P., Palou, A., & Picó, C. (2004). The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology*, *145*(11), 5049–5055. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0493>
- Saper, C. B., Chou, T. C., & Elmquist, J. K. (2002). The Need to Feed: Homeostatic and Hedonic Control of Eating. *Neuron*, *36*(2), 199–211. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00969-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00969-8)
- Schmidt, I., Fritz, A., Schölch, C., Schneider, D., Simon, E., & Plagemann, A. (2001). The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *International Journal of Obesity*, *25*(8), 1168–1174. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801669>
- Schmitz, Y., Benoit-Marand, M., Gonon, F., & Sulzer, D. (2003). Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*, *87*(2), 273–289. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02050.x>
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte Jr., D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661–671. <https://doi.org/10.1038/35007534>
- Shen, M., Jiang, C., Liu, P., Wang, F., & Ma, L. (2016). Mesolimbic leptin signaling negatively regulates cocaine-conditioned reward. *Translational Psychiatry* *2016* *6*:12, *6*(12), e972–e972. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.223>
- Sominsky, L., Ziko, I., Nguyen, T.-X., Andrews, Z. B., & Spencer, S. J. (2017). Early life disruption to the ghrelin system with over-eating is resolved in adulthood in male rats. *Neuropharmacology*, *113*, 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.09.023>
- Sominsky, L., Ziko, I., Nguyen, T. X., Quach, J., & Spencer, S. J. (2017). Hypothalamic effects of neonatal diet: reversible and only partially leptin dependent. *The Journal of Endocrinology*, *234*(1), 41–56. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0631>
- Spencer, S. J., & Jenkins, T. A. (2016). Prenatal and Postnatal Determinants of Brain Development. In *NeuroMethods* (Vol. 109). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3014-2>
- Stefanidis, A., & Spencer, S. J. (2012). Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult Feeding and Energy Expenditure in the Rat. *PLoS ONE*, *7*(12), 52130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052130>
- Tong, Q., Cui, X., Xu, H., Zhang, X., Hu, S., Huang, F., & Xiao, L. (2022). D1 receptor-expressing neurons in ventral tegmental area alleviate mouse anxiety-like behaviors via glutamatergic projection to lateral septum. *Molecular Psychiatry* *2022* *28*:2, *28*(2), 625–638. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01809-y>
- Van de Weerd, H. A., Aarsen, E. L., Mulder, A., Kruitwagen, C. L. J. J., Hendriksen, C. F. M., & Baumans, V. (2010). Effects of Environmental Enrichment for Mice: Variation in Experimental Results. http://Dx.Doi.Org/10.1207/S15327604JAWS0502_01, *5*(2), 87–109. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0502_01
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience* *2000* *1*:3, *1*(3), 191–198. <https://doi.org/10.1038/35044558>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., & Baler, R. D. (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. In *Trends in Cognitive Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>
- Vucetic, Z., Carlin, J. L., Totoki, K., & Reyes, T. M. (2012). Epigenetic dysregulation of

- the dopamine system in diet-induced obesity. *Journal of Neurochemistry*, 120(6), 891–898. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07649.x>
- Vucetic, Z., & Reyes, T. M. (2010). Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: Implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1002/wsbm.77>
- Wan, J., Oliver, V. F., Wang, G., Zhu, H., Zack, D. J., Merbs, S. L., & Qian, J. (2015). Characterization of tissue-specific differential DNA methylation suggests distinct modes of positive and negative gene expression regulation. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1271-4>
- Wang, L., Saint-Pierre, D. H., & Taché, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, 325(1), 47–51. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00241-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00241-0)
- Wei, Y., Yang, C. R., Wei, Y. P., Ge, Z. J., Zhao, Z. A., Zhang, B., Hou, Y., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2015). Enriched environment-induced maternal weight loss reprograms metabolic gene expression in mouse offspring. *Journal of Biological Chemistry*, 290(8), 4604–4619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605642>
- Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J. F., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., Berndt, S. I., Elliott, A. L., Jackson, A. U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H. N., McCarroll, S. A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J. C., Ruccasecca, R. M., Sanna, S., ... Hirschhorn, J. N. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature Genetics*, 41(1), 25–34. <https://doi.org/10.1038/NG.287>
- Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. *Physiology and Behavior*, 74(4–5), 683–701. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00612-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00612-6)
- World Health Organization. (2018). Noncommunicable Diseases Report 2018. *World Health Organization*, 223.
- World Health Organization. (2021). *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Yang, G., Lim, C.-Y., Li, C., Xiao, X., Radda, G. K., Li, C., Cao, X., & Han, W. (2009). FoxO1 Inhibits Leptin Regulation of Pro-opiomelanocortin Promoter Activity by Blocking STAT3 Interaction with Specificity Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3719–3727. <https://doi.org/10.1074/JBC.M804965200>
- Yasrebi, A., Hsieh, A., Mamounis, K. J., Krumm, E. A., Yang, J. A., Magby, J., Hu, P., & Roepke, T. A. (2016). Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17 β -estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422, 42. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.11.007>
- Young, D., Lawlor, P. A., Leone, P., Dragunow, M., & During, M. J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine*, 5(4), 448–453. <https://doi.org/10.1038/7449>
- Zaias, J., Queeney, T. J., Kelley, J. B., Zakharova, E. S., & Izenwasser, S. (2008). Social and physical environmental enrichment differentially affect growth and activity of preadolescent and adolescent male rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(2), 30–34.
- Zhai, D., Li, S., Dong, G., Zhou, D., Yang, Y., Wang, X., Zhao, Y., Yang, Y., & Lin, Z. (2018). The correlation between DNA methylation and transcriptional expression

of human dopamine transporter in cell lines. *Neuroscience Letters*, 662, 91–97.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.10.013>

Anexo estadístico

ANOVA de 2 vías de medidas repetidas de la curva de peso corporal

Two-way RM ANOVA				
Alpha	0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	0.3016	< 0,0001	27	F (27, 450) = 5,717
Tiempo	96.05	< 0,0001	9	F (9, 450) = 5462
Grupo	1.654	< 0,0001	3	F (3, 50) = 28,54
Residual			450	

ANOVA de 2 vías para cada punto de la curva de peso corporal (Figura 22)

Two-way ANOVA		Ordinary								
Alpha	0.05									
Día PostNatal (DPN)	Camada	Ambiente	Interacción	SE:NL vs. SE:SL	SE:NL vs. EE:NL	SE:NL vs. EE:SL	SE:SL vs. EE:NL	SE:SL vs. EE:SL	EE:NL vs. EE:SL	
28	< 0,0001	0.9052	0.29							
35	< 0,0001	< 0,0001	0.9477							
42	< 0,0001	< 0,0001	0.9462							
49	< 0,0001	0.0093	0.0653							
56	< 0,0001	0.0046	0.037	0.0108	0.0034	0.0543	< 0,0001	> 0,9999	< 0,0001	
63	< 0,0001	< 0,0001	0.81							
70	< 0,0001	< 0,0001	0.5843							
77	< 0,0001	< 0,0001	0.0988							
84	0.0012	< 0,0001	0.23							
90	0.1155	< 0,0001	0.8349							

ANOVA de 2 vías de medidas repetidas de la curva de ingesta de alimentos

Two-way RM ANOVA					
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)

Interaction	7.047	< 0,0001	****	30	F (30, 110) = 3,648
Tiempo	84.72	< 0,0001	****	10	F (10, 110) = 131,6
Grupos	1.155	0.0008	***	3	F (3, 110) = 5,981
Residual			450	110	

ANOVA de 2 vías para cada punto de la curva de ingesta de alimentos (Figura 24)

Two-way ANOVA	Ordinary									
Alpha	0.05									
Día PostNatal (DPN)	Camada	Ambiente	Interacción	SE:NL vs. SE:SL	SE:NL vs. EE:NL	SE:NL vs. EE:SL	SE:SL vs. EE:NL	SE:SL vs. EE:SL	EE:NL vs. EE:SL	
28	0.358	0.3493	0.9564							
35	0.0004	0.0069	0.0227	0.6496	0.0146	> 0,9999	0.0007	> 0,9999	0.0014	
42	0.6796	0.3358	0.6193							
49	0.4898	0.034	0.2889							
56	0.5586	0.0044	0.3386							
63	0.8412	0.0022	0.9843							
70	0.723	0.4089	0.9607							
77	0.9527	0.4641	0.8381							
84	0.8609	0.619	0.9866							
90	0.616	0.2744	0.4905							

ANOVA de 2 vías para el peso del tejido adiposo epididimal (TAE) (Tabla 4)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	6.917	0.0452	*	1	F (1, 49) = 0,4198
Ambiente	9.959	0.0175	*	1	F (1, 49) = 6,044
Camada	8.438	0.0281	*	1	F (1, 49) = 5,121
Residual				49	

SE:NL vs. SE:SL	SE:NL vs. EE:NL	SE:NL vs. EE:SL	SE:SL vs. EE:NL	SE:SL vs. EE:SL	EE:NL vs. EE:SL
0.0281	0.0459	0.1999	0.0089	0.0206	0.0499

ANOVA de 2 vías para los niveles de glucosa en suero (Tabla 4)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	1.46	0.5743	ns	1	F (1, 19) = 0,3267
Ambiente	2.107	0.5007	ns	1	F (1, 19) = 0,4714
Camada	10.82	0.1362	ns	1	F (1, 19) = 2,421
Residual				19	

ANOVA de 2 vías para los niveles de colesterol en suero (Tabla 4)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	0.01558	0.9389	ns	1	F (1, 20) = 0,006020
Ambiente	47.75	0.0004	***	1	F (1, 20) = 18,45
Camada	0.4791	0.6716	ns	1	F (1, 20) = 0,1851
Residual				20	

ANOVA de 2 vías para los niveles de triglicéridos en suero (Tabla 4)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	2.199	0.474	ns	1	F (1, 19) = 0,5337

Ambiente	12.03	0.1037	ns	1	F (1, 19) = 2,921
Camada	6.457	0.2258	ns	1	F (1, 19) = 1,567
Residual				19	

**ANOVA de 2 vías para la expresión de diferentes genes en diferentes áreas del cerebro
(Figuras 25, 27 y 29)**

Two-way ANOVA	Ordinary								
Alpha	0.05								
Gen	Camada	Ambiente	Interacción	SE:NL vs. SE:SL	SE:NL vs. EE:NL	SE:NL vs. EE:SL	SE:SL vs. EE:NL	SE:SL vs. EE:SL	EE:NL vs. EE:SL
POMC ARC	0.7392	0.0012	0.1539						
CART ARC	0.1007	0.0867	0.918						
NPY ARC	0.0031	0.1285	0.3014						
AgRP ARC	0.3643	0.2412	0.0013	0.0244	0.58	> 0,9999	0.91	0.02	0.39
Ob-Rb ARC	0.5578	0.0003	0.3281						
IR ARC	0.6721	0.0094	0.4211						
GHSR ARC	0.0008	0,0001	0.0125	> 0,9999	< 0,0001	> 0,9999	< 0,0001	> 0,9999	0
TH ATV	0.7403	0.3752	0.7525						
DRD1 ATV	0.2841	0.0027	0.6328						
DRD2 ATV	0.2402	0.7132	0.9863						
DAT ATV	0.6731	0.133	0.9959						
Ob-Rb ATV	0.3885	0.0038	0.2076						
IR ATV	0.0637	0.0157	0.048	> 0,9999	0.02	> 0,9999	0.03	> 0,9999	0.07
GHSR ATV	0.0306	0.062	0.037	> 0,9999	> 0,9999	0.01	> 0,9999	0.01	0.05
DRD1 NAcC	0.4691	0.0014	0.7642						
DRD2 NAcC	0.446	0.2873	0.5038						
DAT NAcC	0.6538	0.0096	0.4028						

DRD1 NAcSh	0.1466	0.7819	0.0476	0.045	> 0,999 9	> 0,999 9	> 0,999 9	0.89	> 0,999 9
DRD2 NAcSh	0.1242	0.0013	0.4225						
DAT NAcSh	0.1172	0.1623	0.0282	0.012 1	> 0,999 9	> 0,999 9	0.01	0.01	> 0,999 9

ANOVA de 2 vías para el análisis de los resultados del test CPP por grupo experimental (Figura 32)					
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
NL-SE 90					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	0.9075	0.3572	ns	1	F (1, 52) = 0,8628
Luz	44.4	< 0,0001	****	1	F (1, 52) = 42,21
Condicionamiento	0	> 0,9999	ns	1	F (1, 52) = 0,0
Residual				52	

NL-EE 90					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	0.04665	0.8793	ns	1	F (1, 44) = 0,02333
Luz	11.98	0.0185	*	1	F (1, 44) = 5,989
Condicionamiento	0	> 0,9999	ns	1	F (1, 44) = 0,0
Residual				44	

SL-SE 90					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	2.654	0.1204	ns	1	F (1, 44) = 2,508
Luz	48.53	< 0,0001	****	1	F (1, 44) = 45,87
Condicionamiento	0	> 0,9999	ns	1	F (1, 44) = 0,0
Residual				44	

SL-EE 90					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	DF	F (DFn, DFd)
Interaction	14.23	0.0129	*	1	F (1, 40) = 6,781
Luz	1.842	0.3544	ns	1	F (1, 40) = 0,8780
Condicionamiento	0	> 0,9999	ns	1	F (1, 40) = 0,0
Residual				40	

Bonferroni's multiple comparisons test		Adjusted P Value
Luz:Pre-condicionamiento vs. Luz:Post-condicionamiento		0,4379
Luz:Pre-condicionamiento vs. Oscuridad:Pre-condicionamiento		0,0988
Luz:Pre-condicionamiento vs. Oscuridad:Post-condicionamiento		> 0,9999
Luz:Post-condicionamiento vs. Oscuridad:Pre-condicionamiento		> 0,9999
Luz:Post-condicionamiento vs. Oscuridad:Post-condicionamiento		> 0,9999
Oscuridad:Pre-condicionamiento vs. Oscuridad:Post-condicionamiento		0,4379

ANOVA de 2 vías para el análisis de los resultados del test EPM (Figura 32)

Two-way ANOVA	Ordinary	
Alpha	0.05	

N° entrada Ba (Número de entradas a brazos abiertos)			
Source of Variation	% of total variation	P value	F (DFn, DFd)
Interaction	1.665	0.3773	F (1, 46) = 0,7948
Ambiente	0.01161	0.941	F (1, 46) = 0,005545
Camada	2.062	0.3263	F (1, 46) = 0,9844
Residual			

N° entradas Bc (Número de entradas a brazos cerrados)			

Source of Variation	% of total variation	P value	F (DFn, DFd)
Interaction	0.0279	0.9037	F (1, 46) = 0,01481
Ambiente	11.63	0.0167	F (1, 46) = 6,170
Camada	1.233	0.4228	F (1, 46) = 0,6543
Residual			

% tiempo Ba (Porcentaje de tiempo dentro del brazo abierto)			
Source of Variation	% of total variation	P value	F (DFn, DFd)
Interaction	0.05552	0.8669	F (1, 46) = 0,02842
ambiente	0.9266	0.4945	F (1, 46) = 0,4743
camada	9.486	0.0326	F (1, 46) = 4,856
Residual			

% tiempo Bc (Porcentaje de tiempo dentro del brazo cerrado)			
Source of Variation	% of total variation	P value	F (DFn, DFd)
Interaction	0.4318	0.6197	F (1, 46) = 0,2496
Ambiente	19.15	0.0017	F (1, 46) = 11,07
Camada	1.827	0.3094	F (1, 46) = 1,056
Residual			

% t zona neutra (Porcentaje de tiempo dentro de la zona neutra o central)			
Source of Variation	% of total variation	P value	F (DFn, DFd)
Interaction	0.01962	0.9219	F (1, 46) = 0,009707
Row Factor	2.135	0.3094	F (1, 46) = 1,057
Column Factor	4.564	0.1397	F (1, 46) = 2,258
Residual			