

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**“Efectos de la sobrealimentación posnatal temprana en la  
regulación homeostática y hedónica de la ingesta, frente a un  
estímulo de dieta de cafetería en la adultez”**

Lic. Pamela Rocío Fernández

Directora de Tesis: Dra. Cora Stoker  
Co-directora de Tesis: Dra. Guillermina Canesini

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral  
UNL-CONICET

**-Año 2026-**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por la formación de grado y postgrado. Es un orgullo para mi ser parte de la Universidad Pública Nacional.

A la ex Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haber financiado estos años de mi formación académica de posgrado. El rol de ambas instituciones es indispensable para el desarrollo y el progreso científico del país.

A cada uno de los miembros del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL) UNL-CONICET por el compartir cotidiano que hace posible la construcción de la ciencia argentina.

A mis directores de tesis, la Dra. Cora Stoker y la Dra. Guillermina Canesini, por haberme acompañado y formado académicamente, pero en especial humanamente. También gracias a las Chiquis de Clínica que me brindaron tanto afecto durante todo este hermoso camino. Al Dr. Guillermo Ramos por darme la oportunidad de realizar este doctorado en el grupo de Neurobiología y por sus valiosos aportes a lo largo de mi formación. También a las Chiquis de la cátedra de NSP que me sostuvieron en cada momento que necesité. A todas gracias por la confianza, la guía y el aliento durante todo este proceso, por la paciencia y por los aportes que hicieron posible este trabajo. Realmente sin este hermoso grupo humano no hubiese sido posible llegar hasta la meta.

A toda mi familia, Choni, Ginito, Tía Marina y especialmente a Sandrita, que me apoyó incondicionalmente en cada decisión que fui dando en estos años. También a mis nonos, Belkis y Abel que desde el cielo interceden por mí para poder perseverar en el andar.

A Martín, que en estos últimos meses se convirtió en mi mejor compañero de camino y puntal para seguir dando pasos.

Gracias en especial a Jesús y María porque sin dudas fueron y serán el sostén de mi rumbo, allá donde sea que vaya.

## **APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS:**

**PAMELA R. FERNÁNDEZ**, LUISA GAYDOU, ROCÍO SCHUMACHER, MARÍA FLORENCIA ROSSETTI, ANA PAULA GARCÍA, AGUSTINA SABELLA, JORGE GUILLERMO RAMOS, GUILLERMINA CANESINI, CORA STOKER. Early overfeeding and adult anhedonia: Impact of neonatal nutrition on hedonic food regulation in male rats. JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2025.109933>

**PAMELA R. FERNÁNDEZ**, LUISA GAYDOU, ROCÍO SCHUMACHER, MARÍA FLORENCIA ROSSETTI, ANA PAULA GARCÍA, GIANFRANCO GERVASONI MORANDI, JORGE GUILLERMO RAMOS, CORA STOKER, GUILLERMINA CANESINI. Neonatal overnutrition reprograms hypothalamic circuits and shapes distinct adult obesity phenotypes through POMC silencing. Journal of Neurochemistry (2026). <https://doi.org/10.1111/jnc.70449>

AGUSTINA SABELLA, GUILLERMINA CANESINI, LUISA GAYDOU, ROCÍO SCHUMACHER, ADRIÁN BAÑOS, CORA STOKER, VALERIA SIGOT, PAMELA FERNÁNDEZ, JORGE GUILLERMO RAMOS, ANA PAULA GARCÍA. Sex-specific effects of sleep restriction on food intake and neuropeptide expression in zebrafish. JOURNAL OF SLEEP RESEARCH (2025). <https://doi.org/10.1111/jsr.70235>

MARIA FLORENCIA ROSSETTI, ROCIO SCHUMACHER, GUILLERMINA CANESINI, PAMELA FERNÁNDEZ, LUISA GAYDOU, CORA STOKER, JORGE GUILLERMO RAMOS. Enriched environment exposure restores behavioral alterations and transcriptional dysregulation of hippocampal steroidogenic enzymes in a small litter model. JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2025.110024>

MARIA FLORENCIA ROSSETTI, ROCIO SCHUMACHER, GUILLERMINA CANESINI, PAMELA FERNÁNDEZ, LUISA GAYDOU, CORA STOKER, JORGE GUILLERMO RAMOS. Neonatal overfeeding promotes anxiety, impairs episodic-like memory, and disrupts transcriptional regulation of hippocampal steroidogenic enzymes. JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109739>

ROCÍO SCHUMACHER, MARÍA FLORENCIA ROSSETTI, GUILLERMINA CANESINI, LUISA GAYDOU, ANA PAULA GARCÍA, GISELA PAOLA LAZZARINO, PAMELA R. FERNANDEZ, CORA STOKER, MARÍA JOSEFINA CARRIÓ, MARÍA FLORENCIA ANDREOLI, JORGE GUILLERMO RAMOS. Neonatal overfeeding alters the functioning of the mesolimbic dopaminergic circuitry involving changes in DNA methylation and effects on feeding behavior. JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109451>

AGUSTINA SABELLA, GLENDA INÉS MANGIA, PAMELA R. FERNÁNDEZ, MAGALÍ ESTEFANÍA PETEAN. Influence of emotions on eating behavior in workers at the Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina. ACTUALIZACIÓN EN NUTRICIÓN (2022). ISSN 2250-7183.

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1.1 OBESIDAD: DEFINICIÓN E IMPLICANCIAS.....	13
1.2 REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS .....	15
1.2.1 Regulación homeostática .....	17
1.2.2 Regulación hedónica.....	21
1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL .....	24
1.4 MODELO DE CAMADA REDUCIDA COMO INDUCTOR DE OBESIDAD TEMPRANA .....	26
1.5 DIETA CAF COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LA ALIMENTACIÓN OCCIDENTAL ....	28
1.6 PRUEBAS CONDUCTUALES EN ROEDORES.....	29
1.6.1 Conducta relacionada con los alimentos .....	30
1.6.2 Comportamiento relacionado con la ansiedad .....	30
1.6.3 Automatización del análisis conductual en modelos animales .....	31
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 ANIMALES Y TRATAMIENTO DIETARIO.....	34
3.1.1 Inducción de la sobrealimentación neonatal (hasta DPN 21):.....	35
3.1.2 Exposición a la dieta control (hasta el DPN 90):.....	35
3.1.3 Intervención con dieta CAF (hasta el DPN 167):.....	36
3.2 PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO .....	38
3.2.1 Prueba del laberinto en cruz elevado .....	38
3.2.2 Prueba de saciedad sensorial específica.....	39
3.2.3 Desarrollo, implementación y validación de una herramienta de análisis automatizado para el test EPM .....	41
3.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS METABÓLICOS .....	45
3.4 DETECCIÓN DE PRESENCIA DE ANTÍGENOS POR INMUNOFLUORESCENCIA .....	46
3.5 AISLAMIENTO DE NÚCLEOS CEREBRALES MEDIANTE TÉCNICA DE MICRODISECCIÓN .....	48
3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	50
3.6.1 Aislamiento de ARN y transcripción inversa.....	50
3.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	50
3.7 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN .....	51
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4.1 EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN NEONATAL Y DE LA DIETA CAF SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS METABÓLICOS EN MACHOS .....	55
4.1.1 Variables morfológicas en machos.....	55
4.1.2 Peso de parches de tejido adiposo en DPN167 en machos.....	58
4.1.3 Parámetros bioquímicos en DPN167 en machos.....	60
4.1.4 Efectos de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF sobre la ingesta de alimentos en machos.....	61
4.1.5 Efectos de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF sobre la regulación hedónica de la ingesta en machos.....	68
4.1.6 Impacto de la sobrealimentación temprana y de la dieta CAF sobre el sistema homeostático de regulación de la ingesta.....	71
4.1.7 Test conducta.....	75
4.2 EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN NEONATAL Y DE LA DIETA CAF SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y METABÓLICOS EN HEMBRAS .....	78
4.2.1 Variables morfológicas en hembras.....	78
4.2.2 Parches de tejido adiposo en DPN167 en hembras.....	81
4.2.4 Parámetros bioquímicos en DPN 167 en hembras.....	82
4.2.5 Efectos de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF sobre la ingesta de alimentos en hembras.....	83
4.3 VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DEL TEST EPM MEDIANTE RATRACK .....	85
<b>5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>86</b>
5.1 EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN NEONATAL Y LA DIETA CAF SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y METABÓLICOS .....	86
5.2 PROGRAMACIÓN TEMPRANA DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO Y LA RESPUESTA A LA DIETA EN LA ADULTEZ .....	89
5.3 EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE LA SACIEDAD Y LA ANSIEDAD.....	92
5.4 REGULACIÓN DEL SISTEMA HOMEOSTÁTICO HIPOTALÁMICO: EXPRESIÓN GÉNICA Y MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	93
5.5 REGULACIÓN DEL SISTEMA HEDÓNICO MESOLÍMBICO: EXPRESIÓN GÉNICA Y SU INTERACCIÓN CON LA REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA .....	96
5.6 ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DEL EPM MEDIANTE RATRACK.....	98
5.7 INTEGRACIÓN DE RESULTADOS Y ALCANCES DEL ESTUDIO .....	99
<b>6 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA: .....</b>	<b>103</b>

## **ABREVIATURAS**

AgRp: péptido relacionado con Agouti

ARC: núcleo arcuato

CAF: dieta de cafetería

Cart: Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas

CI: control interno

CON: dieta control

DA: dopamina

DAT: transportador activo de DA

DNMT: familia de metiltransferasas de ADN

DOHaD: orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad

DPN: día posnatal

DRD1: receptor DA D1

DRD2: receptor DA D2

EA: eficiencia alimentaria

EBA: entradas en brazos abiertos

EBC: entradas en brazos cerrados

EC: eficiencia calórica

EPM: laberinto elevado en cruz

GABA: ácido gamma aminobutírico

Ghsr: Receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (Receptor de ghrelina) HOMA-

IR: Modelo homeostático para la resistencia a la insulina (Homeostatic Model Assessment)

IAd: índice de adiposidad

IAn: índice de ansiedad

IMC: Índice de masa corporal

InsR: receptor de insulina

L19: Proteína ribosómica 60S L19

L-DOPA: dihidroxifenilalanina

$\alpha$  MSH: hormona estimulante de melanocitos alfa

M: maltodextrina

MC4R: Receptores de melanocortina 4

MSRE: enzimas de restricción sensibles a la metilación

NAC: núcleo accumbens

NACc: núcleo accumbens Core  
NACSh: núcleo accumbens Shell  
NL: camada normal  
NP: solución no preexpuesta  
nPE1: región potenciadora del promotor Pomc  
Npy: neuropéptido Y  
Ob-Rb, isoforma larga del receptor de leptina  
P: solución preexpuesta  
Pomc: proopiomelanocortina  
S: sacarosa  
SAM: grupo donante de metilo S-adenosil metionina  
SL: camada pequeña  
SNC: sistema nervioso central  
SNPC: sustancia negra compacta  
SSE: saciedad sensorial específica  
TAE: tejido adiposo epididimal  
TAG: tejido adiposo gonadal  
TAP: tejido adiposo perirrenal  
TBA: tiempo pasado en los brazos abiertos  
TBC: tiempo pasado en los brazos cerrados  
TH: enzima tirosina hidroxilasa  
TZC: tiempo pasado en la zona central

## RESUMEN

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y su prevalencia va en aumento de manera sostenida a lo largo de las últimas décadas. Numerosos estudios evidencian que la exposición a desequilibrios nutricionales durante períodos críticos del desarrollo, como la etapa neonatal, puede programar de forma persistente los mecanismos que regulan la ingesta alimentaria, el metabolismo energético y la conducta, incrementando el riesgo de desarrollar obesidad y trastornos asociados en etapas posteriores de la vida. En particular, la sobrealimentación temprana ha sido asociada con alteraciones duraderas en los circuitos hipotalámicos que controlan la homeostasis energética, así como en los sistemas de recompensa involucrados en la motivación y el valor hedónico de los alimentos. Sin embargo, más estudios son necesarios para comprender cómo estas alteraciones tempranas interactúan con un entorno obesogénico en la adultez y cuáles son los mecanismos neurobiológicos y epigenéticos subyacentes.

En este contexto, el presente trabajo planteó evaluar el impacto de la sobrealimentación neonatal sobre la regulación de la ingesta alimentaria en la adultez, y analizar cómo la exposición a una dieta de cafetería (CAF), como modelo de ambiente obesogénico, impacta en las alteraciones inducidas tempranamente. Para ello, se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos. Se implementó un modelo experimental de sobrealimentación neonatal en ratas, basado en la reducción del número de crías por madre (4 crías/madre) durante el período de lactancia (Small Litter, SL) y como grupo control, camadas normales (NL) de 10 crías/madre. Luego del destete (DPN 21) hasta DPN 90, fueron alimentados con pellet como dieta control (CON). En la adultez, se conformaron cuatro grupos experimentales: NL-CON, NL-CAF, SL-CON y SL-CAF para dar inicio al segundo *challenge* hedónico por 11 semanas.

El diseño experimental incluyó la evaluación de parámetros morfométricos (peso y longitud naso anal desde el nacimiento al sacrificio) con registros semanales, metabólicos (parámetros bioquímicos, parches adiposos perirrenal y gonadal), conductuales, moleculares (relacionados con la expresión génica de las principales moléculas de interés) y epigenético (análisis de metilación en genes alterados), para dar un enfoque amplio de la problemática planteada. También, se analizaron variables relacionadas la ingesta alimentaria, así como la preferencia y elección de alimentos, registrando semanalmente los alimentos a lo largo de todo el periodo experimental (desde DPN 21 a 167). Las evaluaciones conductuales incluyeron el análisis de la saciedad sensorial específica (SSS, por sus siglas en inglés) como indicador de la regulación hedónica de la ingesta en DPN 140, y el laberinto elevado en cruz (EPM, por sus siglas en inglés) para el estudio de comportamiento relacionado a la ansiedad,

en DPN 130. Tras el sacrificio en DPN 167, se aislaron los parches adiposos, sangre troncal y cerebros para realizar posteriormente las pruebas antes mencionadas.

El análisis molecular se realizó en núcleos cerebrales clave, involucrados en el control de la ingesta. Particularmente, en zonas del hipotálamo como el Núcleo Arcuato (ARC) y regiones del sistema de recompensa mesolímbico del sistema hedónico, como el Área tegmental ventral (VTA), Núcleo Accumbens Core (NAcC) y Shell (NAcSh). Estas regiones cerebrales antes mencionadas se aislaron individualmente utilizando un crióstato para la disección y la técnica de micropunción de Palkovits. Posteriormente, se extrajeron los ácidos nucleicos para la cuantificación de la expresión génica por medio de RT-PCRq y los niveles de metilación del ADN utilizando PCRq mediada por Enzimas de Restricción sensibles a la Metilación (MSRM, por sus siglas en inglés). Los estudios moleculares y epigenéticos se realizaron en machos, mientras que los análisis de ingesta y conducta incluyeron animales de ambos sexos.

También, en el marco de esta tesis se desarrolló y validó “RaTrack”, una herramienta automatizada para el análisis del EPM, con el objetivo de optimizar el procesamiento de los videos y reducir la variabilidad asociada al análisis manual. La validación del software se realizó mediante la comparación de los parámetros obtenidos por análisis automatizado y manual.

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, observamos que la sobrealimentación neonatal induce modificaciones persistentes en la regulación de la ingesta y en la conducta alimentaria, las cuales se manifiestan de manera diferencial según el sexo y el tipo de dieta consumida en la adultez.

La sobrealimentación neonatal y/o la exposición a una dieta CAF en la edad adulta provocan el desarrollo de obesidad, adiposidad, hiperinsulinemia y alteración del Índice HOMA indicando insulinoresistencia. La CAF promueve un aumento de la eficiencia calórica y alimentaria, independientemente de la situación en las primeras etapas de la vida. Las ratas SL-CAF mostraron un comportamiento alimentario alterado (hipofagia), caracterizado por un mayor consumo de CON frente a los alimentos palatables.

La sobrealimentación temprana y/o la dieta CAF alteraron el SSS, en tanto que solamente en la combinación de ambos factores el comportamiento ansioso se vió incrementado.

A nivel transcripcional, la sobrealimentación temprana se asoció con una reducción a largo plazo de la expresión de proopiomelanocortina (Pomc) en ARC, potencialmente relacionada con la hipermetilación del promotor y del enhancer. Por otro lado, la expresión del neuropéptido Y (Npy) se encuentra disminuida en el grupo con la sobrealimentación neonatal,

aparentemente en respuesta a estímulos periféricos, mediado por otras vías regulatorias distintas a la hipermetilación. La expresión del receptor de leptina se reduce con la dieta CAF, lo que sugiere un mecanismo de resistencia a la leptina. Tanto el NL-CAF como el SL-CAF mostraron efectos tendientes a reducir el tono dopaminérgico, pero a través de vías diferentes: la producción de dopamina (DA) en el VTA podría estar reducida mediante la disminución de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en NL-CAF-M, mientras que el SL-CAF-M mostró un aumento de la expresión del transportador activo de dopamina (DAT) en el NAc, lo que podría generar una mayor eliminación de dicho neurotransmisor del espacio sináptico. Por otra parte, en las hembras, la combinación de sobrealimentación neonatal y dieta CAF se asoció con una disminución progresiva del consumo de alimentos dulces y con una conducta hipofágica a lo largo del período experimental, sugiriendo una alteración en los mecanismos que regulan la valoración hedónica de los estímulos alimentarios.

RaTrack demostró una adecuada concordancia con el análisis manual para los brazos abiertos, pero no para los brazos cerrados y zona central, por lo cual es preciso continuar con tareas de programación para convertirlo en un recurso metodológico más fiable.

Nuestra investigación revela distintos fenotipos de obesidad, cada uno con características moleculares, epigenéticas y conductuales específicas. Estos hallazgos ponen de relieve la necesidad de estrategias terapéuticas personalizadas que tengan en cuenta estas diferencias mecánicas. Es importante destacar que la sobrenutrición temprana altera los circuitos reguladores hipotalámicos con efectos duraderos. Estos hallazgos aportan evidencia relevante sobre los mecanismos mediante los cuales las experiencias nutricionales tempranas influyen en la susceptibilidad a desarrollar obesidad y trastornos asociados en la adultez, y destacan la importancia de considerar los períodos críticos del desarrollo en el diseño de estrategias preventivas frente a las enfermedades metabólicas.

## **ABSTRACT**

Obesity is one of the main public health problems worldwide, and its prevalence has steadily increased over recent decades. Numerous studies have shown that exposure to nutritional imbalances during critical periods of development, such as the neonatal stage, can persistently program the mechanisms that regulate food intake, energy metabolism, and behavior, thereby increasing the risk of developing obesity and associated disorders later in life. In particular, early overnutrition has been associated with long-lasting alterations in hypothalamic circuits that control energy homeostasis, as well as in reward systems involved in motivation and the hedonic value of food. However, further studies are needed to understand how these early alterations interact with an obesogenic environment in adulthood and to elucidate the underlying neurobiological and epigenetic mechanisms.

In this context, the present study aimed to evaluate the impact of neonatal overnutrition on the regulation of food intake in adulthood and to analyze how exposure to a cafeteria diet (CAF), as a model of an obesogenic environment, affects early-induced alterations. For this purpose, Wistar rats of both sexes were used. A neonatal overnutrition experimental model was implemented based on litter size reduction during the lactation period (4 pups per dam; Small Litter, SL), while normal litters (10 pups per dam; NL) were used as controls. After weaning (postnatal day, PND 21) and until PND 90, animals were fed a standard chow diet (CON). In adulthood, four experimental groups were established: NL-CON, NL-CAF, SL-CON, and SL-CAF, initiating a second hedonic challenge for 11 weeks.

The experimental design included the evaluation of anthropometric parameters (body weight and naso-anal length from birth to sacrifice), with weekly records; metabolic parameters (biochemical variables and perirenal and gonadal adipose tissue depots); behavioral, molecular (related to the gene expression of key molecules of interest), and epigenetic parameters (DNA methylation analysis of altered genes), providing a comprehensive approach to the proposed research question. Variables related to food intake, as well as food preference and choice, were also analyzed, with weekly recording of food consumption throughout the entire experimental period (from PND 21 to PND 167). Behavioral assessments included the analysis of specific sensory satiety (SSS) as an indicator of hedonic regulation of food intake at PND 140, and the elevated plus maze (EPM) to assess anxiety-like behavior at PND 130. After sacrifice at PND 167, adipose tissue depots, trunk blood, and brains were collected for subsequent analyses.

Molecular analyses were performed in key brain nuclei involved in the control of food intake, particularly hypothalamic regions such as the arcuate nucleus (ARC) and regions of the

mesolimbic reward system related to hedonic regulation, including the ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens core (NAcC), and shell (NAcSh). These brain regions were individually isolated using a cryostat and the Palkovits micropunch technique. Subsequently, nucleic acids were extracted for gene expression quantification by RT-qPCR and for the analysis of DNA methylation levels using methylation-sensitive restriction enzyme-mediated qPCR (MSRM). Molecular and epigenetic analyses were performed in males, whereas food intake and behavioral analyses included animals of both sexes.

Additionally, within the framework of this thesis, an automated tool named RaTrack was developed and validated for EPM analysis, with the aim of optimizing video processing and reducing variability associated with manual analysis. Software validation was conducted by comparing parameters obtained through automated and manual analyses.

Regarding the results obtained in the present study, neonatal overnutrition was found to induce persistent modifications in the regulation of food intake and feeding behavior, which were differentially expressed depending on sex and the type of diet consumed in adulthood. Neonatal overnutrition and/or exposure to a CAF diet in adulthood promoted the development of obesity, increased adiposity, hyperinsulinemia, and alterations in the HOMA index, indicating insulin resistance. CAF exposure promoted an increase in caloric and feeding efficiency, regardless of early-life nutritional status. SL-CAF rats exhibited altered feeding behavior characterized by hypophagia, with increased consumption of standard chow compared to palatable foods.

Early overnutrition and/or CAF diet exposure impaired SSS, whereas anxiety-like behavior was increased only when both factors were combined. At the transcriptional level, early overnutrition was associated with a long-term reduction in proopiomelanocortin (Pomc) expression in the ARC, potentially related to hypermethylation of its promoter and enhancer regions. In contrast, neuropeptide Y (Npy) expression was reduced in neonatally overfed animals, apparently in response to peripheral stimuli and mediated by regulatory pathways other than hypermethylation. Leptin receptor expression was reduced by CAF exposure, suggesting a mechanism of leptin resistance. Both NL-CAF and SL-CAF groups showed effects that tended to reduce dopaminergic tone, but through different pathways: dopamine (DA) production in the VTA may be reduced by decreased tyrosine hydroxylase (TH) expression in NL-CAF-M, whereas SL-CAF showed increased expression of the dopamine transporter (DAT) in the NAc, which could lead to greater clearance of this neurotransmitter from the synaptic cleft. In females, the combination of neonatal overnutrition and CAF diet was associated with a progressive reduction in sweet food consumption and sustained

hypophagic behavior throughout the experimental period, suggesting alterations in mechanisms regulating the hedonic valuation of food stimuli.

RaTrack showed adequate agreement with manual analysis for open arm parameters but not for closed arms or the central zone, indicating that further software development is required to establish it as a more reliable methodological resource.

Overall, our research reveals distinct obesity phenotypes, each characterized by specific molecular, epigenetic, and behavioral features. These findings highlight the need for personalized therapeutic strategies that consider these mechanistic differences. Importantly, early overnutrition induces long-lasting alterations in hypothalamic regulatory circuits. Together, these results provide relevant evidence on the mechanisms by which early nutritional experiences influence susceptibility to obesity and associated disorders in adulthood and underscore the importance of considering critical developmental periods in the design of preventive strategies against metabolic diseases.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 OBESIDAD: DEFINICIÓN E IMPLICANCIAS

La obesidad es un problema de salud pública grave y creciente en todo el mundo, ya que constituye una de las causas de morbilidad y mortalidad con mayor impacto global. Esta epidemia, también es conocida como “globesidad” (Rendina et al., 2019; World Health Organization, 2025).

En los últimos años, el número de personas obesas ha alcanzado cifras alarmantes, afectando tanto a adultos como a niños. En 2022, una de cada ocho personas en todo el mundo padecía obesidad, afección que aumenta las enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, incrementando así el gasto en salud en todo el mundo (Hildebrand & Pfeifer, 2025; World Health Organization, 2025).

La obesidad es una enfermedad crónica, multifactorial y recidivante, caracterizada por una alteración del balance energético entre ingesta y gasto que resulta en acumulación excesiva y/o disfuncional de tejido adiposo y se relaciona con comorbilidades metabólicas (Figura 1) (Lecube et al., 2025; Ministerio de Salud, 2023; World Health Organization, 2025).



**Figura 1.** Esquema de la definición actual de obesidad que integra los principales factores involucrados en el desarrollo y la progresión de la obesidad. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

Este exceso de masa grasa se relaciona con un mayor consumo de alimentos ricos en calorías, característico de la dieta occidental actual, asociado a una menor actividad física debido al estilo de vida sedentario de la población actual, así como también a niveles de estrés aumentados que favorecen el desarrollo del cuadro (World Health Organization, 2025). A este contexto se lo conoce como entorno o ambiente obesogénico, definido como un entorno de vida que favorece una elevada ingesta energética y un estilo de vida sedentario, contribuye de manera significativa a la génesis y la difusión de la obesidad (Rendina et al., 2019).

Esta enfermedad implica factores genéticos, ambientales, metabólicos y conductuales, como los hábitos alimenticios desordenados y los estilos de vida sedentarios (Piché et al., 2020), permitiendo inferir que esta patología puede dar lugar a diferentes fenotipos de obesidad.

Los factores que influyen en la obesidad pueden clasificarse como “no modificables” (condicionamiento genético, epigenética, programación fetal, perturbadores endocrinos y diversos determinantes sociales) y “modificables” (patrón alimentario, sedentarismo, cronodisrupción y privación de sueño, estrés, la microbiota intestinal, hábito tabáquico, etc.) (Lecube et al., 2025).

Dentro de los factores no modificables, numerosos estudios han demostrado que el entorno posnatal temprano tiene un impacto significativo en la homeostasis energética en la adultez. Los primeros años de vida son muy importantes, ya que los niños con sobrepeso tienden a convertirse en adolescentes con sobrepeso y, finalmente, en adultos con sobrepeso, con una mayor incidencia de comorbilidades como hipertensión, diabetes tipo 2 e incluso un mayor riesgo de desarrollar problemas de salud mental, incluida la depresión. Esto conlleva una peor calidad de vida y un mayor gasto en salud en el futuro (Khoury et al., 2013; Ouakinin et al., 2018)

Este concepto está relacionado con el paradigma de los orígenes del Desarrollo Temprano de la Salud y la Enfermedad (del inglés Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD), que destaca cómo la exposición durante los períodos críticos del desarrollo puede predisponer enfermedades en la adultez (Rodrigues et al., 2022; Souza et al., 2022).

En humanos, los primeros 1000 días de vida, desde la concepción hasta los dos años, constituyen la fase crítica para el desarrollo, dado que en este período ocurre la mayor tasa de crecimiento y programación celular Souza et al., 2022.

En este sentido, se ha demostrado que realidades adversas a nivel nutricional, hormonal y ambiental durante estas ventanas de plasticidad aumentan la predisposición a enfermedades no transmisibles en la adultez, como la obesidad y la diabetes. Si bien los mecanismos

epigenéticos parecen ser determinantes en este proceso, evidencia reciente extiende estas ventanas de vulnerabilidad a los periodos de preconcepción y adolescencia (Lisboa et al., 2021).

A pesar de los numerosos intentos por profundizar en la comprensión de los mecanismos implicados en la obesidad, su patogenia aún no está del todo clara. La investigación experimental es una herramienta esencial para el diseño de terapias eficaces, especialmente en edades tempranas (Hoey & Roche, 2024).

Respecto a los factores modificables, está ampliamente reportado que el entorno alimentario moderno facilita la ingesta excesiva de calorías, uno de los principales factores que contribuyen a la obesidad. Se estima que 1 de cada 5 muertes a nivel global son atribuibles a una alimentación inadecuada relacionada al aumento de consumo de alimentos ultraprocesados acompañada de la disminución de alimentos caseros y naturales. Esto se asocia con una mayor prevalencia de sobrepeso, obesidad, síndrome metabólico, aumento de adiposidad abdominal y visceral, y menor salud cardiovascular (Steele et al., 2023). Los alimentos ultraprocesados son formulaciones industriales de sustancias alimenticias procesadas (aceites, grasas, azúcares, almidón, aislados de proteínas) acompañadas de saborizantes, colorantes, emulsionantes y otros aditivos cosméticos (Steele et al., 2023).

En línea con lo expuesto anteriormente, las recientes Guías Alimentarias de Estados Unidos 2025–2030 plantean un cambio de paradigma en las recomendaciones nutricionales, al desplazar el foco hacia los alimentos mínimamente procesados, priorizar proteínas de calidad y desalentar el consumo de productos ultraprocesados (USDA, 2025).

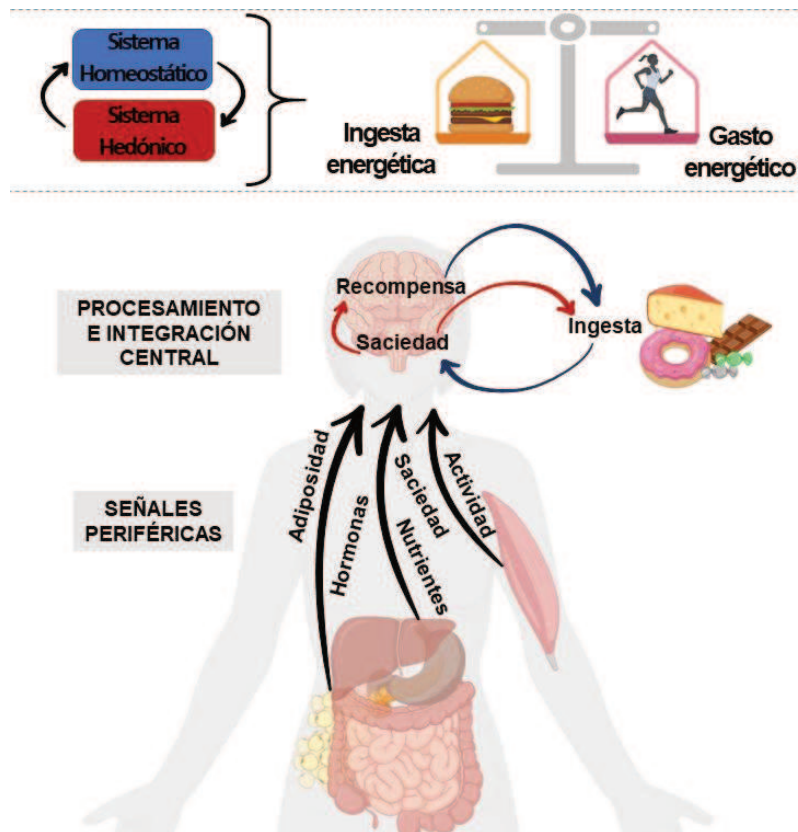
## **1.2 REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS**

El Sistema Nervioso Central (SNC) integra la información procedente de las reservas de energía (por ejemplo, la leptina) y de la ingesta de alimentos (nutrientes y señales de saciedad derivadas del intestino, por ejemplo) para regular la ingesta de alimentos y el gasto energético de manera que se mantengan estables las reservas del organismo en el tiempo. La sobrealimentación induce un balance energético positivo, inhibe las propiedades gratificantes (o recompensa) de los alimentos, mientras que estimula la saciedad, reduciendo la ingesta. Por otra parte, la disminución de energía disponible en el organismo activa respuestas adaptativas del SNC que aumentan la recompensa de los alimentos y reduce la respuesta a las señales de saciedad, estimulando la ingesta hasta reponer las reservas (Figura 2) (Morton et al., 2014).

Este equilibrio energético es un proceso complejo, que a nivel cerebral implica dos sistemas estrechamente entrelazados: el sistema homeostático, estado metabólico que regula el equilibrio energético y el sistema hedónico, relacionado con la recompensa/placer (Berthoud, 2012; Pandit et al., 2012).

Las vías homeostáticas incluyen el hipotálamo y el tronco encefálico, y se encargan de integrar la ingesta adecuada de alimentos en respuesta a las reservas de energía y un ajuste en el gasto energético. Las vías hedónicas se encuentran principalmente en las áreas corticolímbicas, y la principal función es promover el comportamiento alimentario (Van Galen et al., 2021).

Originalmente, se pensaba que la regulación de ambos sistemas funcionaba de forma independiente. Sin embargo, hoy en día se sabe que la condición metabólica puede verse fácilmente influenciada por los mecanismos de recompensa y motivación del sistema hedónico. En este contexto, el sistema hedónico ha sido particularmente vulnerable al entorno alimentario moderno, cargado de estímulos con elevada palatabilidad, a la par de que el sistema homeostático no ha logrado compensar este fenómeno (Barsh & Schwartz, 2002; Berthoud, 2012). Recientemente se ha propuesto que el NPY (neuropéptido Y), relacionado clásicamente con el sistema homeostático por sus propiedades orexigénicas, tiene un papel clave en el sistema hedónico de regulación de la ingesta de alimentos (Marinescu & Labouesse, 2024). Además de regular el control homeostático de la alimentación y tener efecto ansiolítico, el NPY también parece influir tanto en el consumo, en la motivación y en el restablecimiento de las recompensas, incluidas las drogas de abuso y los alimentos apetecibles, tal y como lo refiere (Rezitis et al., 2022).



**Figura 2.** Regulación central de la ingesta en función del estado energético. El SNC integra señales hormonales y nutricionales para ajustar la ingesta y el gasto energético. El exceso de energía reduce la recompensa alimentaria y potencia la saciedad, mientras que el déficit energético incrementa la recompensa de los alimentos y disminuye la respuesta a señales de saciedad, favoreciendo la ingesta. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

### 1.2.1 Regulación homeostática

El tronco encefálico y en particular el hipotálamo, pertenecientes al SNC, se consideran las principales regiones cerebrales de la regulación homeostática de la ingesta de alimentos (Cifuentes & Acosta, 2022).

Ambas regiones pueden subdividirse en varios núcleos, de los cuales los más importantes para la regulación de la ingesta de alimentos son los núcleos del rafe, el núcleo del tractus solitarius (NTS) y el núcleo parabrancial (PBN) del tronco encefálico (Figura 3). Mientras que en el hipotálamo, el ARC, el núcleo paraventricular (PVN), medial ventral (VMN) y el hipotálamo lateral (LH) son los más relevantes (Figura 3) (Van Galen et al., 2021).

Todos ellos están fuertemente interconectados y reciben información central y periférica, con el fin de adaptar adecuadamente el comportamiento alimentario posterior al estado nutricional actual (Van Galen et al., 2021). En particular, ARC es el punto de entrada, situado en la base del hipotálamo (cerca del tercer ventrículo) cercano a la barrera hematoencefálica, una posición estratégica para recibir señales periféricas e integrarlas con las señales de otras

regiones del cerebro, comunicándose a través de proyecciones descendentes a los núcleos hipotalámicos vecinos y a las áreas mesolímbicas relacionadas con la recompensa (Rossi & Stuber, 2018; Schumacher et al., 2021; Van Galen et al., 2021; Vohra et al., 2022).

En el ARC, hay dos poblaciones neuronales que median esta regulación. Por un lado, se encuentran las neuronas orexigénicas, que estimulan el apetito, coexpresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con el agouti (AgRP) y se activan durante los estados de déficit energético. Por otro lado, las neuronas anorexigénicas (que suprimen la ingesta de alimentos) se caracterizan por la coexpresión de proopiomelanocortina (POMC) y transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Berthoud et al., 2017; Rossi & Stuber, 2018). Los grupos neuronales de NPY/AgRP tienen respuesta rápida ya que están diseñadas inicialmente para comenzar la ingesta ante situaciones de carencia. Las neuronas POMC/CART se relacionan con una respuesta de tipo tónica, más lenta y a largo plazo para regular la saciedad.

El precursor POMC es una prohormona, dependiente de enzima, que se transforma en la hormona estimulante de melanocitos alfa ( $\alpha$  MSH). La  $\alpha$  MSH es el ligando principal que activa los receptores de melanocortina 4 (MC4R) para reducir la ingesta. Su respuesta está relacionada a la saciedad posprandial, como estímulo anorexigénico, pero además contribuye al metabolismo energético aumentando el gasto mediante la activación del sistema nervioso simpático, promoviendo la termogénesis (Rossi & Stuber, 2018; Janicka et al., 2025). Recientemente se ha informado que las neuronas POMC difieren, mientras algunas responden a estímulos como la glucosa y otras lo hacen a las hormonas, indicando una regulación especializada y compleja del balance energético (Vohra et al., 2022).

Por su parte, los péptidos AgRP y NPY son liberados en el cerebro participando como neurotransmisores que participan activamente en la regulación de la ingesta alimentaria, tal como se refirió anteriormente. Las neuronas AgRP/NPY, así como neuropéptidos de ácido gamma aminobutírico (GABA) durante las condiciones de ayuno, proporciona señales anti termogénicas y da como resultado una acción orexigénica. Ante condiciones de privación de alimentos se ha visto una mayor expresión del ARNm de AgRP y NPY en ARC, mientras que las condiciones de realimentación restauran estos niveles a su valor basal relativamente rápido. En particular, NPY actúa de forma rápida debido a que su actividad está mediada por receptores acoplados a proteínas G para estimular la ingesta inmediata (Vohra et al., 2022; Campos et al., 2022).

Las neuronas AgRP inhiben a las neuronas POMC mediante acciones antagónicas de GABA y NPY, mientras envían proyecciones colaterales a muchas regiones cerebrales diferentes que se corresponden con las proyecciones POMC (Timper & Brüning, 2017).

Un punto importante de resaltar es que en ambas poblaciones neuronales se encuentran receptores de estrógeno, ejerciendo el estradiol su acción sobre la ingesta de forma directa, al aumentar la expresión de genes anorexigénicos en las neuronas POMC y al disminuir la expresión de genes orexigénicos en las neuronas NPY/AgRP (Vigil et al., 2022).

La leptina, es una hormona peptídica liberada principalmente por los adipocitos maduros, pero su síntesis también se ha demostrado en pequeñas cantidades en otros tejidos como la placenta, el músculo esquelético, el hígado y el hipotálamo. El hipotálamo es el principal tejido *target* de la acción de la leptina, donde es un potente supresor de la alimentación. La forma larga del receptor de leptina (OBRb) se encuentra principalmente en ARC (Conceição et al., 2011). Allí, los receptores de leptina se expresan en las neuronas POMC y CART estimulando su función anorexigénica (suprimiendo la alimentación) fundamentalmente por aumento de la actividad de las neuronas POMC/CART, al mismo tiempo que aumenta la tasa metabólica. En segundo lugar, el receptor de leptina se encuentra presente en un segundo conjunto de neuronas que expresan NPY y AgRP. La leptina actúa allí de manera inhibitoria (Lutter & Nestler, 2009). La incapacidad del sistema nervioso central, especialmente de los núcleos hipotalámicos involucrados en la homeostasis energética, para responder adecuadamente a la señal de la leptina, se define como resistencia a la leptina. Esta resistencia central a la leptina puede caracterizarse por la incapacidad de la hormona periférica para llegar al hipotálamo, la disminución del número de receptores de leptina hipotalámicos y/o la alteración de la transducción de la señal de la leptina (Zhang & Scarpace, 2006).

La insulina es un polipéptido producido por las células  $\beta$  pancreáticas, cuya secreción se eleva en proporción al aumento del nivel de glucosa en sangre (rol periférico en la homeostasis glucémica) Asimismo, junto con la leptina, actúa como una señal del estado energético del organismo, reflejando los niveles de adiposidad. Esta hormona atraviesa la barrera hematoencefálica para ingresar al cerebro donde ejerce su función mediada por los receptores específicos (InsR), que se expresan en gran medida en varias partes del SNC, incluido el ARC, tanto en neuronas POMC/CART como en las neuronas NPY/AgRP (Vohra et al., 2022). En síntesis, estimula a las neuronas productoras de neuropéptidos anorexígenos e inhibe a las neuronas productoras de neuropéptidos orexigénicos. La leptina y la insulina se regulan mutuamente. Así, la leptina inhibe la producción de insulina por las

células beta pancreáticas, mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el adipocito (Tsai et al., 2012).

En condiciones de homeostasis metabólica, los depósitos de tejido adiposo actúan como órganos endocrinos dinámicos, cuya actividad varía según su localización anatómica. Mientras que el depósito retroperitoneal destaca por su elevada tasa lipolítica, el tejido perigonadal (epididimal en machos y parametrial en hembras) se caracteriza por una mayor capacidad de expansión y sensibilidad a la insulina, facilitando el almacenamiento eficiente de energía mediante la lipogénesis (Chusyd et al., 2016; Tsai et al., 2012).

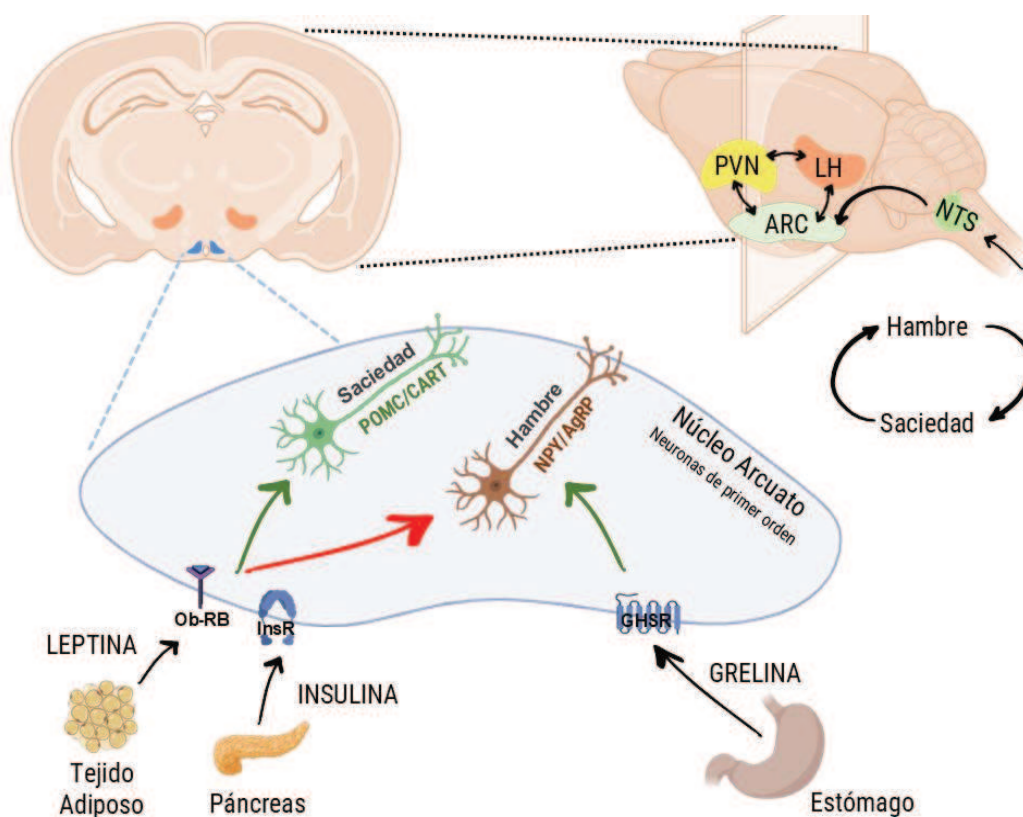
En las hembras, los estrógenos actúan como moduladores de esta respuesta, protegiendo inicialmente al tejido parametrial de la inflamación y predispone a un menor acúmulo de grasa. En general, el estradiol impacta en el sistema homeostático al reducir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético, relacionados a efectos anorexígenos y termogénicos. El estradiol actúa a nivel de la corteza cerebral, el hipotálamo y el tronco encefálico, por lo cual estos efectos están mediados directamente, por mecanismos genómicos y no genómicos, e indirectamente, mediante la activación de mediadores periféricos como la insulina y la leptina (Argente-Arizón et al., 2016; Quirós Cognuck et al., 2020; Vigil et al., 2022).

Ante un balance calórico positivo crónico y el desarrollo de obesidad, esta especialización funcional se altera significativamente. La hipertrofia de los adipocitos, particularmente en el depósito perigonadal, desencadena una respuesta inflamatoria local que interfiere con la señalización de la insulina, promoviendo la resistencia periférica a esta hormona (Teixeira et al., 2019; Chusyd et al., 2016). Paralelamente, la síntesis de leptina se incrementa de forma proporcional a la masa adiposa; no obstante, en el estado obeso, esta hiperleptinemia suele derivar en una resistencia central a la hormona, anulando su capacidad para regular el apetito y el gasto energético (Tchkonja et al., 2013). Así, la disfunción de estos depósitos viscerales no solo altera el metabolismo lipídico local, sino que se convierte en el motor de la desregulación metabólica sistémica.

Otra importante hormona implicada en la regulación de la ingesta es la ghrelina, hormona peptídica sintetizada en el fondo del estómago que actúa a través del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHSR), que se expresa principalmente en el cerebro (Cornejo et al., 2021). Particularmente, actúa sobre las neuronas AgRP/NPY de ARC, desempeñando un papel fundamental en la respuesta adaptativa a la deficiencia energética ya que estimula estas neuronas y promueve el comportamiento alimentario.

En el SNC, los receptores de ghrelina se expresan en las neuronas AgRP/NPY en ARC, donde estimulan la liberación de estos neuropéptidos para inhibir los MC4R, contrarrestando los efectos de las neuronas POMC y aumentando la ingesta de alimentos. Las neuronas AgRP/NPY son activadas por la ghrelina e inhibidas por la leptina; sin embargo, también son estimuladas por señales sensoriales anticipatorias (Campos et al., 2022).

En conjunto, la ghrelina actúa como una señal periférica que informa al sistema nervioso central sobre la baja disponibilidad energética, activando circuitos hipotalámicos orexigénicos para restablecer el balance energético (Lutter & Nestler, 2009; Vohra et al., 2022). La Figura 3 resume la regulación homeostática de la ingesta de alimentos.



**Figura 3.** Regulación homeostática de la ingesta de alimentos a nivel hipotalámico. En el núcleo arcuato (ARC) se representan las neuronas de primer orden POMC/CART (anorexigénicas) y NPY/AgRP (orexigénicas), moduladas por señales periféricas como leptina (tejido adiposo), insulina (páncreas) y ghrelina (estómago). Estas neuronas proyectan hacia núcleos hipotalámicos de segundo orden, como el núcleo paraventricular (PVN) y el área hipotalámica lateral (LH), integrando señales de hambre y saciedad. NTS: Núcleo del tracto solitario. Ob-RB: receptor de leptina; InsR: receptor de insulina; GHSR: receptor de ghrelina. Flechas verdes indican excitación y rojas inhibición. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

### 1.2.2 Regulación hedónica

El control hedónico de la ingesta de alimentos se produce principalmente por el sistema de recompensa mesolímbico, donde las vías clave son las dopaminérgicas y las opioides. La

regulación dopaminérgica de la ingesta de alimentos involucra tres áreas críticas en el estriado (el núcleo caudado, el putamen y el núcleo accumbens). Estas regiones reciben información de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNPC) o del área tegmental ventral (VTA). Las vías de la SNPC generalmente modulan la actividad motora, mientras que las de la VTA influyen en la motivación y los comportamientos relacionados con la recompensa. Se cree que esta modulación se produce a través de conexiones recíprocas entre la corteza y el estriado, lo que permite la integración de la información sensoriomotora (Bayassi-Jakowicka et al., 2021).

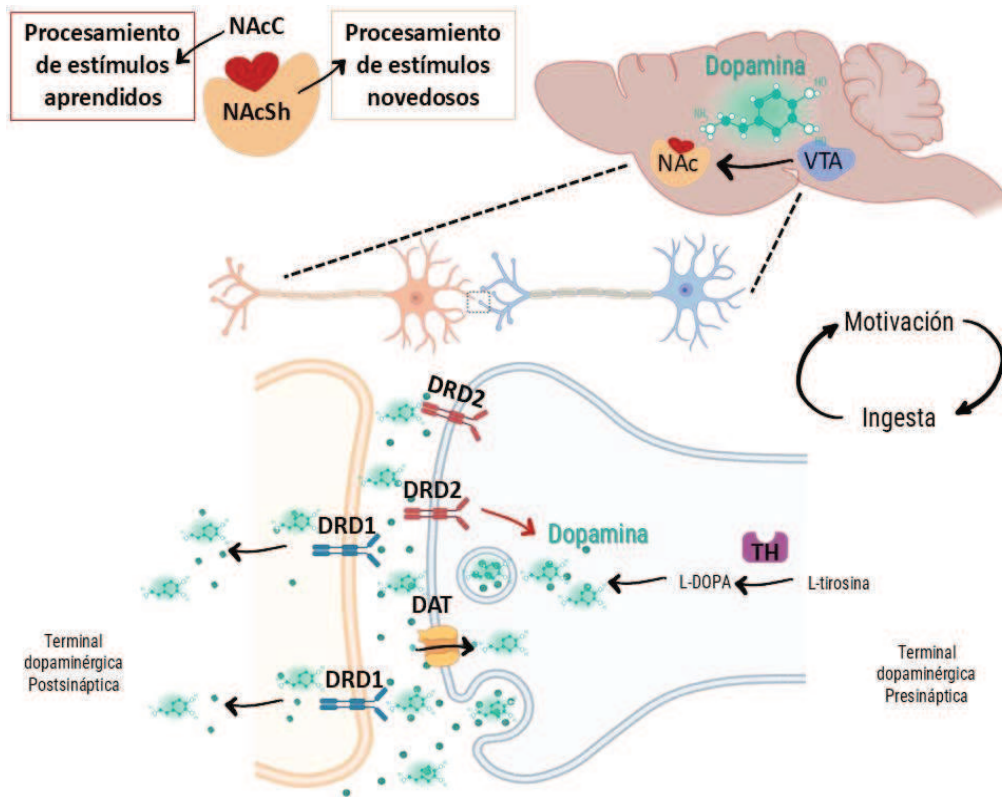
La DA, es uno de los neurotransmisores más importantes en la regulación hedónica ya que desempeña un papel motivador e incentivador en la ingesta de alimentos vinculado al deseo, la exploración y el aprendizaje. En el cuerpo estriado y otras regiones críticas del prosencéfalo, como la corteza prefrontal, median el aprendizaje por incentivos y los mecanismos de refuerzo asociados a la recompensa positiva (Kelley, 2004). Se ha demostrado que la ingestión de alimentos altamente apetecibles induce la liberación de DA en el estriado dorsal, en proporción al placer subjetivo asociado al consumo. No obstante, el rol de la DA en los procesos de recompensa es más complejo que la simple codificación del valor hedónico (Volkow et al., 2011).

Las neuronas dopaminérgicas son esenciales para los comportamientos de recompensa y motivación. En el cuerpo de estas neuronas situadas en el VTA, el aminoácido tirosina es hidroxilado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) a L-DOPA (dihidroxifenilalanina), paso limitante que determina su biodisponibilidad. La señalización de la DA termina en el espacio sináptico mediante la recaptación por el DAT y la degradación enzimática a través de la catecol-O-metiltransferasa (Figura 4) (Campos et al., 2022; Schumacher et al., 2021).

La actividad de las neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde la VTA al núcleo accumbens (NAc) desempeña un papel muy importante en el proceso de toma de decisiones durante la fase preparatoria del comportamiento alimentario, lo que también lo convierte en un punto particularmente importante para estudiar (Vucetic & Reyes, 2010). El núcleo accumbens se organiza en dos subregiones funcionales: la *shell* (NAcSh) y el *core* (NAcC). El NAcSh se encarga de procesar los estímulos nuevos y está relacionado con la motivación de los estímulos hedónicos, mientras que el NAcC interviene en los estímulos aprendidos (Rossi & Stuber, 2018; Zhu et al., 2016). NAcSh funciona en parte como un vínculo crítico entre los circuitos corticales y los circuitos hipotalámicos del tronco cerebral en lo que respecta al control de la ingesta de alimentos, mientras que NAcC está implicados en el aprendizaje y la ejecución de acciones instrumentales adaptativas, ajustando la conducta en

función del valor del resultado (Kelley, 2004). Durante la primera exposición a una recompensa alimentaria, o ante una recompensa inesperada, se observa un aumento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA, lo que se traduce en una mayor liberación de DA en NAc. Sin embargo, con exposiciones repetidas, la respuesta dopaminérgica ante el alimento se atenúa y se desplaza progresivamente hacia los estímulos que predicen su disponibilidad, como el olor o la apariencia de la comida. Estos estímulos adquieren entonces un valor predictivo y funcionan como señales condicionadas de recompensa. En este contexto, la liberación de DA frente a dichas señales refleja la diferencia entre la recompensa esperada y la obtenida, un fenómeno conocido como "error de predicción de la recompensa" que puede contribuir a desajustes en la regulación de la ingesta de alimentos (Volkow et al., 2011).

En cuanto a los receptores implicados en la actividad de la DA, los de mayor importancia son los de tipo 1 (DRD1) y 2 (DRD2). El DRD1 es relevante en el aprendizaje relacionado con la recompensa, incluida la traducción de la motivación en acción. El DRD2 funciona como un autoreceptor somatodendrítico, regulando la neurotransmisión de la DA y suprimiendo la liberación de DA en respuesta a los impulsos (Schumacher et al., 2021). En el NAc, los niveles elevados de DA aumentan la ingesta de alimentos a través de la activación de las neuronas que expresan receptores DRD1, al tiempo que aumentan el gasto energético a través de la inhibición de las neuronas que expresan receptores DRD2. Por el contrario, una menor actividad de las neuronas con DRD1 y una mayor actividad de las neuronas DRD2 provocan una reducción tanto de la ingesta como del gasto energético (Rezitis et al., 2022).



**Figura 4.** Regulación Hedónica de la ingesta de alimentos mediada por el sistema de recompensa mesolímbico. Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) proyectan hacia el núcleo accumbens (NAc) *Shell* (NAcSh) y *Core* (NAcC), regulando la motivación, el aprendizaje por recompensa y el comportamiento alimentario. La señalización dopaminérgica se encuentra modulada por los receptores DRD1, DRD2 y DAT. Flecha roja inhibición. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

En este sistema, los reguladores homeostáticos periféricos del equilibrio energético, como la leptina, la insulina, la orexina y la ghrelina modulan las propiedades gratificantes de los alimentos. Estos neuropéptidos también podrían estar implicados en el control cognitivo de la ingesta de alimentos y en el condicionamiento a los estímulos alimentarios interactuando con receptores de las neuronas DA del VTA, que se proyectan al NAc. Se ha demostrado que sujetos resistentes a la insulina presentan una mayor activación en las regiones límbicas cuando se expusieron a estímulos alimentarios (Volkow et al., 2011).

### 1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

La metilación del ADN, es una modificación química directa que modula la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN en respuesta a diversos estímulos ambientales a lo largo de la vida (Lazzarino et al., 2017; Rossetti et al., 2024; Schumacher et al., 2021; Souza et al., 2020).

La metilación de la quinta posición de la citosina (5mC) es una modificación epigenética del ADN muy conservada que se encuentra en la mayoría de los modelos procarióticos y

eucarióticos, y tiene un impacto fundamental en la estabilidad del genoma, la expresión génica y el desarrollo. La metilación del ADN tiene lugar casi por completo en el dinucleótido citidina-guanina (CpG) y se estima que se produce en casi el 70-80 % de los sitios CpG de todo el genoma. Este fenómeno es un elemento crucial en el control de la expresión precisa de la información genética, y tanto la hipermetilación como la hipometilación se han asociado con una expresión génica inadecuada (Kadayifci et al., 2018).

Este cambio epigenético del ADN, es catalizado por una familia de metiltransferasas de ADN (DNMT) que transfieren un grupo metilo desde el donante de metilo S-adenosil metionina (SAM), a la posición 5' del carbono del anillo de citosina que se encuentra, en la mayoría de los casos, en la secuencia dinucleotídica CG, conocidas como islas CpG. Cabe señalar que, aunque se asumía que estos patrones eran estables en células postmitóticas, la persistente expresión de DNMT en neuronas adultas sugiere un rol dinámico de la metilación del ADN en el cerebro (Allison et al., 2021).

La metilación del ADN en sitios críticos silencia (inhibe la expresión) los genes mediante dos mecanismos principales: en primer lugar, la metilación en sitios críticos inhibe la unión de los factores de transcripción a sus elementos de reconocimiento; en segundo lugar, la metilación de una región reguladora del ADN recluta proteínas de unión al ADN metilado, y enzimas de modificación de la cromatina, que a su vez, introduce modificaciones en las histonas que dan lugar al silenciamiento de la cromatina (Allison et al., 2021).

Hay dos tipos de factores que pueden alterar la regulación epigenética de las vías de metilación: factores genéticos (polimorfismo y mutaciones genéticas), que pueden causar una metilación anómala del ADN; y factores potencialmente modificables como la variación de nutrientes esenciales que intervienen en el metabolismo de los grupos metilo. Así, la nutrición es un factor importante no solo por su influencia en la expresión génica, sino también porque las alteraciones nutricionales tempranas podrían ser responsables del desarrollo posterior de enfermedades crónicas a través de mecanismos epigenéticos (Kadayifci et al., 2018).

El período posnatal temprano constituye una ventana clave para las modificaciones epigenéticas, ya que la sobrenutrición temprana y la composición de la dieta a lo largo de las etapas de la vida ejercen efectos directos sobre las vías de metilación del ADN asociadas a cambios persistentes en la fisiología de diferentes tejidos en la vida adulta, fenómeno que se conoce como programación metabólica (Conceição et al., 2011).

Los cambios epigenéticos persistentes pueden afectar a genes implicados en la homeostasis energética, como *Pomc* y *NPY*, lo que podría contribuir a una desregulación a largo plazo de

la ingesta de alimentos y un mayor riesgo de obesidad (Lisboa et al., 2021; Mahmood et al., 2013; Plagemann et al., 2009, 2010). De hecho, se ha descrito que varios genes implicados en el control de la ingesta de alimentos están regulados a través de la metilación del ADN (Lazzarino et al., 2017; Marousez et al., 2019; Rossetti et al., 2019; Schumacher et al., 2021; Souza et al., 2022).

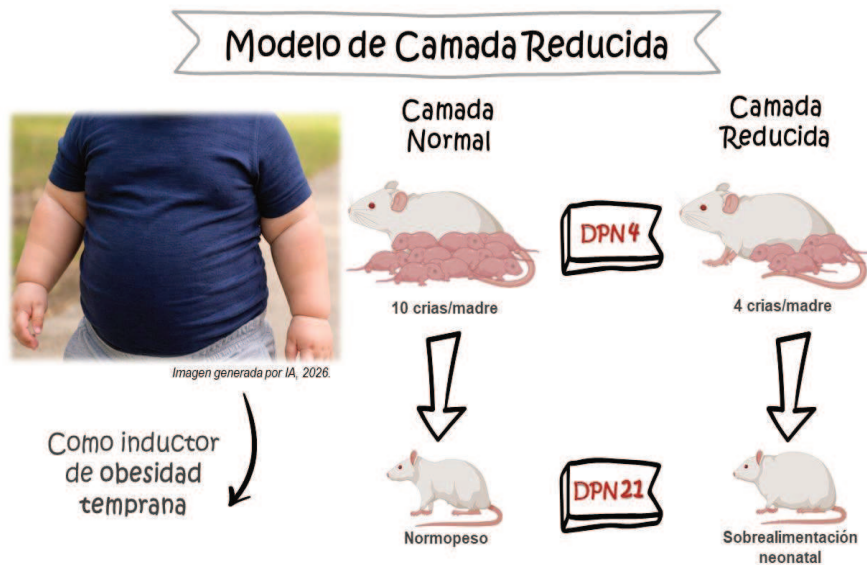
#### **1.4 MODELO DE CAMADA REDUCIDA COMO INDUCTOR DE OBESIDAD TEMPRANA**

Se ha demostrado que criar roedores en camadas pequeñas (SL) es un modelo experimental útil para estudiar las consecuencias de la obesidad producida por la sobrealimentación neonatal que centra su importancia en el paradigma DOHaD, que destaca cómo la exposición durante los períodos críticos del desarrollo puede predisponer a diversas patologías (Amaro et al., 2023; Habbout et al., 2013; Marousez et al., 2019; Spencer & Tilbrook, 2009).

En la actualidad, se sugiere que la plasticidad fenotípica de los roedores está sujeta a estos períodos críticos, lo cual se evidencia en cómo una misma agresión, por ejemplo, la restricción de proteínas, puede programar estados de malnutrición opuestos (obesidad o desnutrición) (Lisboa et al., 2021).

En este sentido, un factor determinante en la programación metabólica es el dimorfismo sexual. Evidencia reciente indica que las condiciones nutricionales, ambientales y hormonales tempranas impactan de manera diferenciada a machos y hembras. Específicamente durante la lactancia, modelos experimentales como la reducción de la camada han demostrado que ambos sexos responden de forma distinta a los insultos metabólicos, sugiriendo que la vulnerabilidad y las trayectorias de desarrollo son dependientes del sexo (Lisboa et al., 2021).

Como se muestra en la Figura 5, las camadas artificialmente pequeñas de tres a cuatro crías, frente a las camadas de control de ocho a doce crías por madre, da lugar a una menor competencia por la leche durante el periodo de lactancia, lo que conduce a una sobrenutrición debido al aumento del volumen de leche (aproximadamente 1,5 veces más) así como también de las calorías. Además, la composición de la leche de las madres SL cambia, proporcionando un mayor contenido de lípidos, especialmente triglicéridos y una menor cantidad de proteínas (Marousez et al., 2019; Souza et al., 2022).



**Figura 5.** Modelo experimental de sobrealimentación neonatal por reducción del tamaño de la camada como inductor de obesidad temprana. DPN: día postnatal. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

Debido a este aumento en el consumo de leche, los roedores criados en camadas pequeñas tienen sobrepeso al destete, pero los niveles pueden variar entre cepas, origen y tamaño de la reducción de la camada. La mayoría reporta incrementos del 10–25 % del peso corporal en ratas adultas y del 20–30 % en ratones en comparación con controles. Este fenotipo parece estar asociado principalmente a un aumento persistente del consumo de alimentos en la adultez, dado que la restricción de la ingesta tras el destete previene tanto el aumento de peso como la proliferación de tejido adiposo (Habbout et al., 2013).

Como se muestra en la figura 5, este aumento acelerado del peso corporal al destete, asociado con mayor adiposidad trae aparejado alteraciones metabólicas y en los circuitos hipotalámicos reguladores de la ingesta de alimentos y el equilibrio energético. La caracterización del fenotipo de obesidad del SL destaca cambios hormonales y metabólicos adaptativos tempranos y tardíos, involucrados en la hiperfagia, los cambios en el gasto energético, la resistencia a la insulina y hasta alteraciones en el área reproductiva (Plagemann et al., 2009; Schumacher et al., 2023; Souza et al., 2022).

La sobrealimentación promovida por el aumento del volumen de leche puede afectar directamente a la función celular y tisular, como la del páncreas, o indirectamente, mediante alteraciones hormonales. La hiperleptinemia y la hiperinsulinemia tempranas en respuesta a la sobrealimentación parecen afectar a los sistemas centrales y periféricos, contribuyendo a la hiperfagia, los cambios en el gasto energético y la resistencia a la insulina. La hiperfagia puede deberse a la inflamación hipotalámica y a cambios en los mecanismos reguladores de

la saciedad y el gasto energético, como el eje cerebro-intestino. Por lo tanto, varias alteraciones complejas están involucradas en el fenotipo obeso del modelo SL lo que hace difícil establecer una relación causal entre los cambios que presentan las crías (Souza et al., 2022).

### **1.5 DIETA CAF COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LA ALIMENTACIÓN OCCIDENTAL**

El entorno nutricional en la edad adulta también influye en la regulación del equilibrio energético. Ciertos alimentos, en particular los ricos en azúcares y grasas, son recompensas potentes que promueven la ingesta (incluso en ausencia de una necesidad energética) y desencadenan asociaciones aprendidas entre el estímulo y la recompensa (condicionamiento). En términos evolutivos, esta propiedad de los alimentos apetecibles solía ser ventajosa porque garantiza que se comiera cuando había alimento disponible, lo que permitía almacenar energía en el cuerpo como grasa, para futuras necesidades en entornos donde las fuentes de alimentos eran escasas. Sin embargo, en las sociedades modernas, donde la comida está ampliamente disponible, esta adaptación se ha convertido en un factor difícil de controlar (Volkow et al., 2011).

En relación a la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de la obesidad, se han implementado varios modelos dietéticos en roedores para inducir la obesidad en la edad adulta, como la dieta alta en grasas, la dieta alta en azúcares o alimentos apetecibles para los humanos, como la dieta CAF (Doulberis et al., 2020).

A nivel experimental, exponer a roedores a una dieta CAF durante la edad adulta, es un modelo ampliamente aceptado para estudiar la inducción de la obesidad (Lalanza & Snoeren, 2021; Lazzarino et al., 2017).

Como se puede observar en la Figura 6, esta dieta se utiliza experimentalmente como modelo para imitar el sistema alimentario actual, ya que incluye alimentos industrializados variados, muy apetecibles y densos en energía, ricos en grasas y azúcares simples, también llamados “comida chatarra” (Lazzarino et al., 2019; Sampey et al., 2011). Tiene la ventaja de permitir la novedad, la elección y la variedad, características clave del entorno alimentario humano moderno con sus propiedades hedónicas (Lalanza et al., 2014; Lalanza & Snoeren, 2021). Además, se ha demostrado que es un buen modelo para inducir alteraciones metabólicas y para estudios que investigan cambios neuroconductuales (Bonfim et al., 2021; Lalanza & Snoeren, 2021).

Esto ofrece una mayor relevancia traslacional en comparación con otras dietas experimentales, ya que no solo se centra en la obesidad inducida por la dieta, sino también en la influencia del entorno obesogénico en la regulación del comportamiento alimentario y el metabolismo (Leigh et al., 2019; Mattar et al., 2023).



**Figura 6.** Modelo experimental de dieta CAF para mimetizar la dieta occidental actual, rica en alimentos palatables de consumo humano. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

Frente a las amplias disparidades que existen actualmente en los protocolos dietéticos de la CAF, (Lalanza & Snoeren, 2021) propusieron un protocolo CAF estandarizado con el objetivo de minimizar las diferencias entre estudios y mejorar la reproducibilidad del modelo de dieta obesogénica. De este modo, el protocolo CAF estándar debe contemplar: 1) la palatabilidad, 2) la inclusión de sabores salados y dulces, 3) la presencia de diferentes texturas, 4) la novedad y 5) la variedad de los productos alimenticios. Una forma sistemática y controlada de integrar estas características es mediante un formato de “menú”, que consiste en dividir el total de los alimentos en tres o cuatro grupos y rotarlos periódicamente, garantizando así que los animales experimenten variedad y novedad en la dieta.

### 1.6 PRUEBAS CONDUCTUALES EN ROEDORES

Las pruebas de comportamiento en modelos animales constituyen una herramienta fundamental para el estudio de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a procesos complejos como la ansiedad, el estrés, el miedo y la motivación. Estos ensayos permiten evaluar de manera integrada la respuesta del organismo frente a estímulos ambientales controlados, aportando información funcional que complementa los análisis moleculares,

neuroanatómicos y fisiológicos. En este sentido, la evaluación conductual no solo contribuye a la caracterización fenotípica de los modelos experimentales, sino que también refuerza la validez translacional de los hallazgos hacia condiciones humanas (Cryan & Holmes, 2005).

### **1.6.1 Conducta relacionada con los alimentos**

Un parámetro importante para comprender la relación entre la programación cerebral y el sistema dopaminérgico es el comportamiento ante los alimentos de los animales de laboratorio y relacionado con los cambios observados en los parámetros moleculares, el peso y la ingesta de alimentos.

Así, la saciedad sensorial específica es un fenómeno que se refiere a un proceso hedónico que influye en la ingesta de alimentos al reducir la satisfacción con los mismos y renovar el apetito cuando se expone a un nuevo sabor (Hetherington, 1996). Este fenómeno puede ser observado y evaluado, tanto a nivel experimental como en los seres humanos. Particularmente, se basa en que la exposición repetida a un alimento determinado reduce selectivamente su valor hedónico y el consumo asociado, sin afectar la respuesta hacia otros alimentos sensorialmente distintos.

En otras palabras, el valor hedónico disminuye cuando se consume un alimento concreto durante mucho tiempo. Sin embargo, la oferta de un nuevo alimento con atributos sensoriales diferentes presenta un valor hedónico que permanece relativamente inalterado, este fenómeno se denomina saciedad sensorial específica (González et al., 2022; Rolls et al., 1981).

### **1.6.2 Comportamiento relacionado con la ansiedad**

Otro parámetro relevante en este estudio es la valoración de los niveles de ansiedad, definida como un estado emocional negativo asociado con la percepción de amenaza caracterizado por sentimientos de aprensión (Kraeuter et al., 2019).

La obesidad en los primeros años de la vida se encuentra asociado a elevados niveles de ansiedad, depresión y estrés. También las dietas altas en calorías se han relacionado con cambios estructurales en el sistema nervioso central y comportamientos relacionados con la ansiedad a nivel experimental como en humanos (Bonfim et al., 2021; Ferreira et al., 2018). A nivel experimental, aunque existen varias pruebas para el análisis del comportamiento relacionado con la ansiedad, la más utilizada en roedores es el test del laberinto elevado en cruz (EPM, por sus siglas en inglés) (Enes-Marques & Giusti-Paiva, 2018; Rossetti et al., 2024; Spencer & Tilbrook, 2009).

La prueba se basa en la tigmotaxis, es decir la tendencia natural de los roedores a evitar los lugares abiertos o elevados, contrarrestada por su curiosidad innata por explorar zonas que les son desconocidas. De esta manera, un roedor menos ansioso visitará más los brazos abiertos de la plataforma, mientras que elevados niveles de ansiedad están relacionados a un mayor tiempo en los brazos cerrados (Kraeuter et al., 2019).

### **1.6.3 Automatización del análisis conductual en modelos animales**

Para los test de conducta, se utilizan las filmaciones para registrar el desafío sin generar alteraciones en el animal. En los últimos años se han desarrollado métodos automatizados para la cuantificación de parámetros conductuales relacionados con el estrés, la ansiedad y el miedo en modelos animales. Habitualmente, estas conductas se evalúan mediante pruebas de corta duración, cuyo registro en video permite su análisis posterior de forma manual o automatizada. Si bien el análisis manual se basa en la observación del investigador, este enfoque es altamente demandante en tiempo y susceptible a variabilidad inter e intraobservador (González-Gaspar et al., 2021). En este contexto, la automatización del análisis conductual surge como una estrategia para reducir el tiempo de evaluación y estandarizar los criterios de cuantificación. Sin embargo, los sistemas comerciales suelen implicar altos costos, escasa flexibilidad, falta de transparencia en los algoritmos utilizados y limitaciones de compatibilidad. Frente a ello, los avances recientes en procesamiento de imágenes y video han favorecido la búsqueda del desarrollo de algunas herramientas de código abierto, reproducible y de bajo costo.

En particular, ante la necesidad de analizar de manera más eficiente los videos recopilados durante el test del EPM, se buscaron herramientas de software que agilice este proceso. Aunque existen opciones disponibles, la mayoría son pagas, requieren condiciones específicas para la grabación del video o se centran en el seguimiento de los animales. La única herramienta gratuita disponible al momento del análisis del test EPM fue Analixity (González-Gaspar et al., 2021).

## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Como hipótesis de trabajo proponemos que la sobrealimentación neonatal programa de manera persistente los circuitos cerebrales que regulan la ingesta, y que un segundo desafío obesogénico en la adultez (dieta CAF) potencia estas alteraciones programadas tempranamente.

El *objetivo general* de este trabajo es conocer el impacto del exceso de la energía ingerida durante la lactancia, como modelo de obesidad neonatal, sobre la regulación de la ingesta alimentaria en la adultez a nivel homeostático (representados principalmente por el hipotálamo) y hedónico (que implica al sistema de recompensa cerebral) ante un desafío de dieta CAF.

El diseño experimental incluye machos y hembras, considerando el análisis de las variables morfométricas, metabólicas y de ingesta alimentaria en ambos sexos. Debido a las limitaciones de tiempo y recursos disponibles, las determinaciones moleculares y otros parámetros complementarios detallados a continuación, se realizaron en machos. Las muestras correspondientes a las hembras, se conservaron para su análisis en una etapa de investigación posterior.

*Objetivos específicos:* Se pretenden evaluar en ratas de ambos sexos, criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL), expuestas en la adultez a dieta control (CON) o CAF por 11 semanas:

- La progresión del peso y el largo naso-anal durante el todo el período de estudio.
- La ingesta durante la totalidad del período experimental y su relación con las variables mencionadas en el ítem anterior.
- La masa adiposa al momento del sacrificio como indicador del impacto de la sobrealimentación neonatal y/o de la dieta de CAF.
- Parámetros bioquímicos de interés (glucosa, triglicéridos y colesterol) para determinar posibles alteraciones metabólicas al momento del sacrificio.
- La expresión de moléculas clave implicadas en la vía de señalización del sistema de recompensa mesolímbico, relacionado al control hedónico de la ingesta, en el área tegmental ventral (ATV) y en el núcleo accumbens (NAc) aislados mediante la técnica de micropunción.
- La expresión de neuropéptidos y de receptores hormonales relacionados al control homeostático de la ingesta a nivel hipotalámico, en el núcleo arcuato (ARC) aislados mediante la técnica de micropunción.

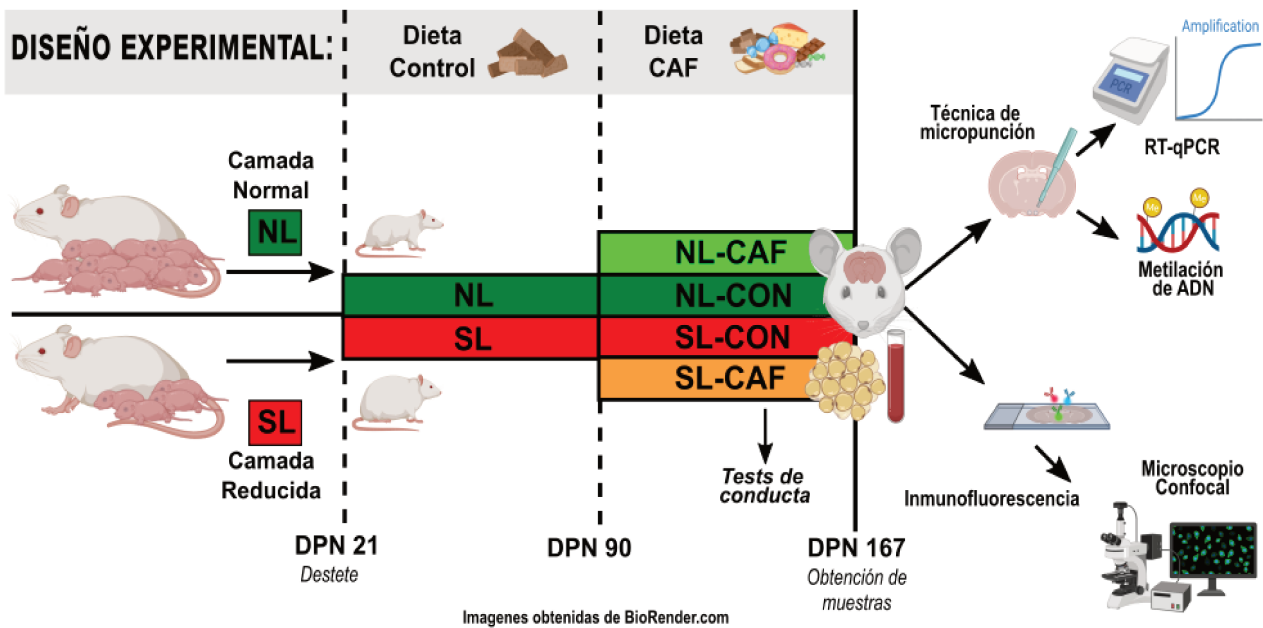
- La presencia de proteínas asociadas a los genes de interés, por inmunofluorescencia en cerebros.
- La presencia de modificaciones epigenéticas de secuencias regulatorias de los principales genes involucrados en el sistema hedónico y homeostático.
- La performance del test de saciedad sensorial específica para evaluar cambios en la conducta hacia los alimentos, mediados por el sistema dopaminérgico.
- La performance del test Laberinto en cruz Elevado (EPM, del inglés *Elevated plus maze*) para evaluar conductas vinculadas a la ansiedad.
- Desarrollar y validar una herramienta de software de acceso gratuito y libre, para el análisis automatizado de videos de test de conducta en ratas.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMALES Y TRATAMIENTO DIETARIO**

Se obtuvieron ratas hembras (n=22) y machos (n=5) (F0) de la cepa Wistar/Cmedc del ICIVET Litoral (UNL, Esperanza, Argentina). Las ratas hembras se aparearon con machos de fertilidad comprobada y se utilizaron crías de ambos sexos para la realización de este trabajo. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas ( $22 \pm 2$  °C y ciclos de luz-oscuridad de 12:00 h) durante todo el período experimental. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la FFCB-UNL (número de referencia CE2021- 92), de conformidad con los principios propuestos por la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” publicada por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (National Research Council, 2011).

El diseño experimental (Figura 7) se estructuró en tres etapas: en primer lugar, la inducción de la sobrealimentación neonatal (DPN 4-21), cada una con su grupo de control correspondiente; en segundo lugar, la administración de CON hasta el DPN 90 para garantizar una progresión adecuada del desarrollo; y, en tercer lugar, la exposición a una dieta CAF durante la edad adulta (hasta el DPN 167) como desafío obesogénico, incluyendo también controles emparejados. Para minimizar los posibles efectos de la camada y garantizar la heterogeneidad experimental, se distribuyeron animales provenientes de diferentes madres entre los grupos experimentales (como máximo dos hermanos por grupo experimental). Las crías se asignaron a los diferentes tratamientos mediante un proceso de aleatorización simple para minimizar el riesgo de sesgo. Este enfoque supone que los grupos experimentales se forman a partir de muestras aleatorias e independientes, lo que permite analizar la variabilidad total del conjunto de datos (Kim & Shin, 2014)..



**Figura 7.** Esquema del diseño experimental realizado en ratas de ambos sexos criadas en camadas normales (NL) o camadas reducidas (SL) y alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). La totalidad de los animales fueron criados simultáneamente bajo las mismas condiciones experimentales y expuestos a los tratamientos correspondientes. Los mismos individuos fueron seguidos longitudinalmente a lo largo del protocolo experimental. Para las evaluaciones conductuales y determinaciones bioquímicas se utilizó la totalidad de los animales de cada grupo experimental para ambos sexos ( $n = 24 \pm 2$ /grupo hasta el destete, luego  $n = 12 \pm 2$ /grupo). Para los análisis de biología molecular (expresión génica por qPCR y estudios epigenéticos), se empleó un subgrupo representativo de animales ( $n = 5-6$ /grupo). Para los estudios de inmunofluorescencia se utilizó un animal por grupo, con fines de confirmación anatómica cualitativa. Tras el sacrificio, se recolectaron cerebros y parches adiposos. RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real; DPN: día posnatal. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

A continuación, se ofrece una descripción detallada de cada etapa:

### 3.1.1 Inducción de la sobrealimentación neonatal (hasta DPN 21):

El tamaño de las camadas se ajustó en el DPN 4, momento en el que la lactancia está adecuadamente establecida, hay mayor facilidad para manipular los animales y sexar con seguridad. Según el modelo de camada pequeña, los animales fueron asignados a camadas pequeñas (SL) para sobrealimentación posnatal (4 crías por camada) o a camadas normales (NL) como grupo de control (10 crías por camada) (Fiorotto et al., 1991).

### 3.1.2 Exposición a la dieta control (hasta el DPN 90):

En DPN 21, tras el destete, los animales se distribuyeron aleatoriamente de 3 a 4 por jaula con libre acceso a comida y agua. Ambos grupos experimentales (NL y SL) fueron alimentados con dieta CON (información nutricional: 3,00 kcal/g; grasa: 5 %, proteína: 23 %, carbohidratos: 72 %; Cooperación, ACA Nutrición Animal, Buenos Aires, Argentina) desde el destete hasta la edad adulta (DPN 90.)

### 3.1.3 Intervención con dieta CAF (hasta el DPN 167):

A partir de entonces, los animales SL y NL se dividieron en otros dos grupos: uno de ellos continuó con la dieta CON (SL-CON; NL-CON) y el otro fue alimentado con dieta CAF (SL-CAF; NL-CAF), durante 11 semanas ( $n = 12 \pm 2$  animales por grupo). La dieta CAF incluyó alimentos palatables de consumo humano, con alto contenido en grasas y azúcares (variedad de galletitas saladas y dulces, bizcochos, postre de maní, queso parmesano, magdalenas, obleas, etc), junto con *pellet* (dieta CON). Estos alimentos se ofrecían de forma alterna para proporcionar un estímulo novedoso (grupos de 3 alimentos, dulces y salados, cambiándolos 3 veces por semana) (Tabla 1). Todos los alimentos se proporcionaron *ad libitum* y se presentaron por separado para facilitar la cuantificación de las sobras. En función de sus características nutricionales, los alimentos CAF se agruparon en categorías (por ejemplo, dulces, salados y pellets estándar), lo que nos permitió evaluar los patrones de elección espontánea de alimentos a lo largo del tiempo, en lugar de realizar una única evaluación de las preferencias. Según la información nutricional, la dieta CAF proporcionaba una media de 4,7 kcal/g (grasa: 47 %, proteína: 7 %, carbohidratos: 49 %). La composición nutricional detallada de los artículos de la dieta CON y CAF se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Lista de grupos de alimentos de dieta CAF y rotaciones semanales.

SEMANA 1			
<b>Lunes</b>	<i>Chizito</i>	<i>Galletitas Rex</i>	<i>Galletitas Oreo</i>
<b>Miércoles</b>	<i>Chizito</i>	<i>Galletitas 9 de oro</i>	<i>Bombón Oblibón</i>
<b>Viernes</b>	<i>Galletitas Rex</i>	<i>Chizito</i>	<i>Galletitas Oblita</i>
SEMANA 2			
<b>Lunes</b>	<i>Chizito</i>	<i>Galletitas Rex</i>	<i>Rhodesia</i>
<b>Miércoles</b>	<i>Chizito</i>	<i>Galletitas Toddy</i>	<i>Magdalena</i>
<b>Viernes</b>	<i>Galletitas Rex</i>	<i>Queso Parmesano</i>	<i>Postre de Maní Marrakech</i>

Todos los días se corroboró que los animales tengan los tres alimentos de consumo humano disponibles, junto con la dieta CON.

**Tabla 2.** Lista de alimentos seleccionados para la dieta de CAF y composición nutricional. Se indica el contenido calórico total, hidratos de carbono, proteínas y grasas totales por cada 100g de alimento.

Alimento	Kcal/100g	Carbohidratos		Proteínas		Grasas	
		<i>g</i>	<i>kcal</i>	<i>g</i>	<i>kcal</i>	<i>g</i>	<i>kcal</i>
Bizcochos salados "9 de oro"	487	60	240	9	36	24	216
"Rhodesia"	522	62	248	4,7	18,8	28	252
Chizitos "Julicroc"	472	64	256	6,8	27,2	20,8	187,2
Galletitas dulces "Toddy"	477	63	252	5,4	21,6	20,3	182,7
Galletitas saladas "Rex"	468	64	256	8,8	35,2	20	180
Magdalena "Gaona"	416	56	224	5,2	20,8	19,2	172,8
Galletitas dulces "Oreo"	494	66	264	5	20	23	207
Bombón "Oblibon"	554	60	240	6,4	25,6	32	288
Galletitas dulces "Oblita"	500	67	268	3,4	13,6	27	243
Postre de maní "Marrakech"	541	57	228	13	52	29	261
Queso parmesano "La Quesera"	410	3	12	33	132	29	261
Dieta CON	300	72	288	23	92	5	75

Todos los animales incluidos completaron el protocolo experimental y ningún animal se enfermó ni murió durante el estudio.

El consumo de alimentos (en gramos) se calculó como la diferencia entre los alimentos ofrecidos y los restos durante el periodo posterior al destete. La ingesta energética diaria se calculó utilizando los datos proporcionados por la información nutricional (kcal/g). Durante todo el experimento, se registraron semanalmente el peso corporal y la longitud (distancia nasoanal). El peso corporal se registró mediante una balanza digital (Ohaus), con precisión de 1 g, colocando al animal en una jaula previamente tarada. La longitud naso-anal se determinó como la distancia entre la punta de la nariz y el ano del animal (sin incluir la cola), utilizando una regla milimetrada fijada sobre una superficie plana, con el animal en posición de decúbito ventral y correctamente alineado. Durante la medición, los animales fueron

contenidos manualmente de forma suave para evitar movimientos y asegurar la precisión de la determinación, siguiendo metodologías previamente reportadas para la evaluación de parámetros antropométricos en roedores (Othman et al., 2021). Estos parámetros se utilizaron para el cálculo del IMC, calculado como peso corporal (g)/longitud<sup>2</sup> (cm<sup>2</sup>) (Novelli et al., 2007; Oliva et al., 2021).

Durante el periodo CAF, se utilizaron la ingesta acumulada de alimentos y el aumento de peso corporal para calcular la eficiencia calórica (EC) = ganancia de peso (g)/ingesta energética (kcal) y la eficiencia alimentaria (EA) = ganancia de peso (g)/ingesta de alimentos (g) (Novelli et al., 2007; White et al., 2009).

La eutanasia se realizó el DPN167 con CO<sup>2</sup> y posterior guillotinado tras un ayuno de 12 horas, aproximadamente entre las 8 y 10hs. Inmediatamente después del sacrificio, se recolectó sangre troncal, se centrifugaron las muestras para almacenar el suero a -50 °C hasta su análisis.

Se disecaron y pesaron los parches de tejido adiposo epididimal (TAE), o gonadal (TAG) en las hembras y perirrenal (TAP). TAE/G se utilizó por su sensibilidad a los cambios metabólicos, mientras que el TAP complementó el análisis reflejando el estado de los depósitos. En conjunto, brindaron una estimación de la grasa visceral. El IAd (%) se estimó como (TAE + TAP) /peso corporal × 100 (Aiassa et al., 2022; Novelli et al., 2007; Vargas et al., 2025).

Se obtuvieron los cerebros de los animales. Algunos de ellos, los que estaban destinados para el análisis con técnicas de biología molecular, se congelaron con la parte ventral hacia arriba en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su seccionamiento. El resto se fijaron por inmersión en paraformaldehído por 24 hs en frío con el posterior procesamiento histológico hasta la inclusión en parafina para la realización de técnicas de inmunofluorescencia (Schumacher et al., 2021).

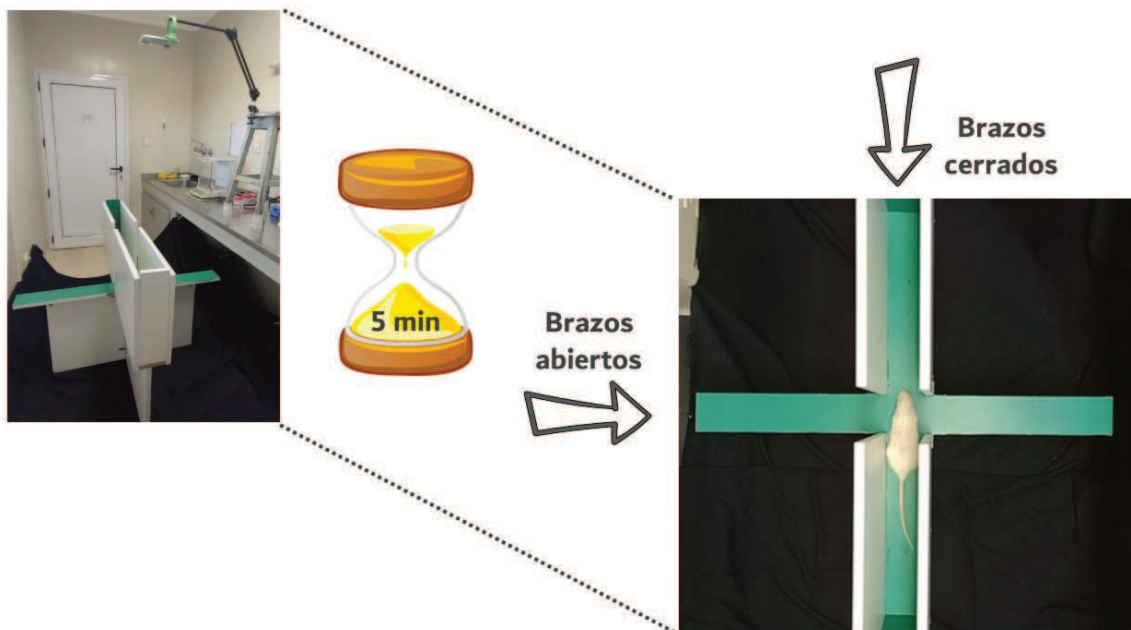
## **3.2 PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO**

### **3.2.1 Prueba del laberinto en cruz elevado**

Se evaluó el comportamiento de ansiedad de los animales mediante la prueba del laberinto en cruz elevado (EPM, por sus siglas en inglés). Esta se realizó adaptando la técnica descrita por Lanza et al. y Walf A., Frye C., (Lanza et al., 2014; Walf & Frye, 2007), en el día DPN 130. Todo el aparato se elevó 50 cm por encima del suelo. La plataforma consta de dos brazos cerrados opuestos con paredes laterales (50 cm de largo, 10 cm de ancho y 40 cm de alto) y dos brazos abiertos (50 cm de largo y 10 cm de ancho) (Figura 8). El animal se colocó en el centro del laberinto (siempre mirando hacia el mismo brazo cerrado) durante 5

minutos. La señal para comenzar a medir el intervalo de tiempo en el brazo específico fue la presencia de las 4 patas dentro del brazo.

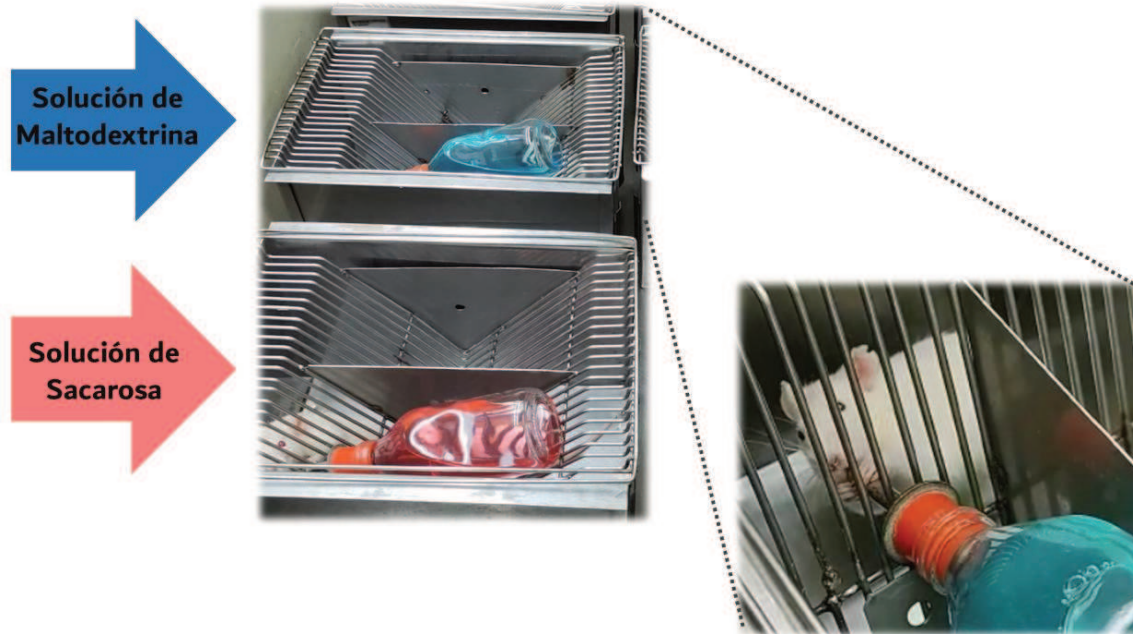
Se cuantificó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (TBA), en los brazos cerrados (TBC) y en la zona central (TZC) del laberinto. También se registró el número de entradas en los brazos abiertos (EBA) y en los brazos cerrados (EBC). Además, tal y como propuso González-Gaspar et al. (2021). estos parámetros se utilizaron para calcular el IAn, como resultado de:  $1 - ([TBA/duración\ de\ la\ prueba] + [EBC/(EBA + EBC)]/2)$ . Este índice cuantifica los niveles de ansiedad (valores cercanos a 1 indican mayor ansiedad y cercanos a 0 menor). El laberinto se limpió con etanol al 5 % después de cada prueba para evitar la influencia de olores de las ratas previamente sometidas a prueba. La actividad de los animales se registró mediante un sistema de vídeo y, a continuación, cada vídeo se analizó manualmente.



**Figura 8.** Esquema de la estructura utilizada para el test del Laberinto elevado en cruz. Se muestran los brazos abiertos y cerrados que son determinantes para evaluar la conducta ansiosa de los animales. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de [BioRender.com](https://www.biorender.com).

### 3.2.2 Prueba de saciedad sensorial específica

Para evaluar este fenómeno conductual, se realizó un test homónimo, puesto a punto previamente en nuestro laboratorio (Schumacher et al., 2023) (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema de las soluciones administradas durante la prueba de saciedad sensorial específica. La solución de maltodextrina se representa en color celeste y la solución de sacarosa en color rosa. Elaboración propia.

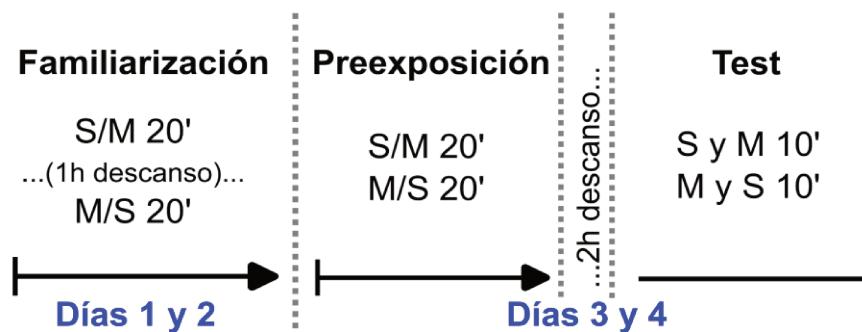
En DPN 140, durante cuatro días consecutivos, se midió el volumen consumido de sacarosa (S) y maltodextrina (M) (ambas al 10 %, disueltas en agua del grifo y coloreadas para identificarlas, rosa o azul claro respectivamente) para cada animal en las etapas correspondientes (familiarización, preexposición y prueba de elección). La sacarosa (disacárido) presenta un sabor intensamente dulce y alta palatabilidad, mientras que la maltodextrina (polisacárido derivado del almidón) posee un sabor neutro, con menor componente hedónico pero aporte calórico similar. Esta elección permitió discriminar entre el componente hedónico y el valor energético de la ingesta. Las soluciones fueron coloreadas con colorantes aptos para consumo alimentario (rosa: sacarosa; celeste: maltodextrina) a fin de facilitar su identificación, sin afectar la ingesta ni el comportamiento de los animales.

La prueba se desarrolló en la fase diurna, entre las 09:00 y las 13:00 hs, durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad de los animales. La elección de esta franja horaria responde a la necesidad de estandarizar las condiciones experimentales y minimizar la variabilidad asociada a los ritmos circadianos, asegurando la comparabilidad entre los distintos grupos experimentales. Este criterio es consistente con lo reportado en el estudio en el que se basa la implementación del SSS (Reichelt et al., 2014) y con su puesta a punto previa en nuestro grupo de trabajo ( Schumacher et al., 2023). Durante este período, los animales tuvieron libre acceso al alimento correspondiente a cada grupo experimental, mientras que el acceso al

agua fue restringido a un intervalo diario de 2 horas (de 13:00 a 15:00 h), durante el cual se colocaron las botellas con agua.

En la etapa de “Familiarización” (los dos primeros días), se pusieron en contacto a los animales con ambas soluciones (S y M) en dos sesiones de 20 minutos, separadas por un intervalo de 1 hora. El tercer día, se realizó la etapa de “Pre Exposición” a una de las soluciones durante 20 minutos y, tras 2 horas, se llevó a cabo la prueba de elección exponiendo a los animales a las dos soluciones simultáneamente (dándoles la posibilidad de elegir).

El cuarto día, se realizó la “Pre Exposición” a la otra solución y, a continuación, la “Prueba de Elección”, lo que permitió una comparación intra-sujeto. El volumen consumido se midió en cada etapa por la diferencia de peso de las botellas antes y después de ofrecerlas a los animales (Figura 10). Un mayor volumen consumido de la solución novedosa (solución no preexpuesta, NP) indica un SSS conservado, mientras que volúmenes similares consumidos de la solución no novedosa (preexpuesta, P) y NP indican la ausencia de este fenómeno.



**Figura 10.** Esquema del protocolo de la prueba de saciedad sensorial específica. La solución de maltodextrina (M) y la solución de sacarosa (S). Elaboración propia.

### **3.2.3 Desarrollo, implementación y validación de una herramienta de análisis automatizado para el test EPM**

En el presente trabajo, tras la dificultad de implementar Analixity, la única herramienta gratuita disponible al momento (González-Gaspar et al., 2021). El principal motivo fue, que las condiciones de grabación de los videos no cumplían con los requisitos exigidos por el software, lo cual dificultó el seguimiento correcto de los animales durante el procesamiento de los registros.

Estas restricciones y dificultades motivaron el desarrollo de una estrategia de análisis propia con apoyo de personal idóneo, basada en un enfoque interdisciplinario, para optimizar la evaluación de los parámetros conductuales de interés.

### Etapa I: Desarrollo colaborativo de la herramienta de análisis

Para atender la necesidad de automatizar el procesamiento de los videos del test del EPM se contactaron a especialistas, miembros del Instituto de Investigación en Señales, Sistemas e Inteligencia Sinc (i).

En diversas reuniones se informó a los especialistas la metodología del test EPM y los parámetros que eran de interés evaluar. También se proyectaron algunos videos para un análisis *a priori* del comportamiento de los animales durante la *performance* del experimento. Tras estos detalles preliminares comenzaron las tareas de desarrollo del software propiamente dicho.

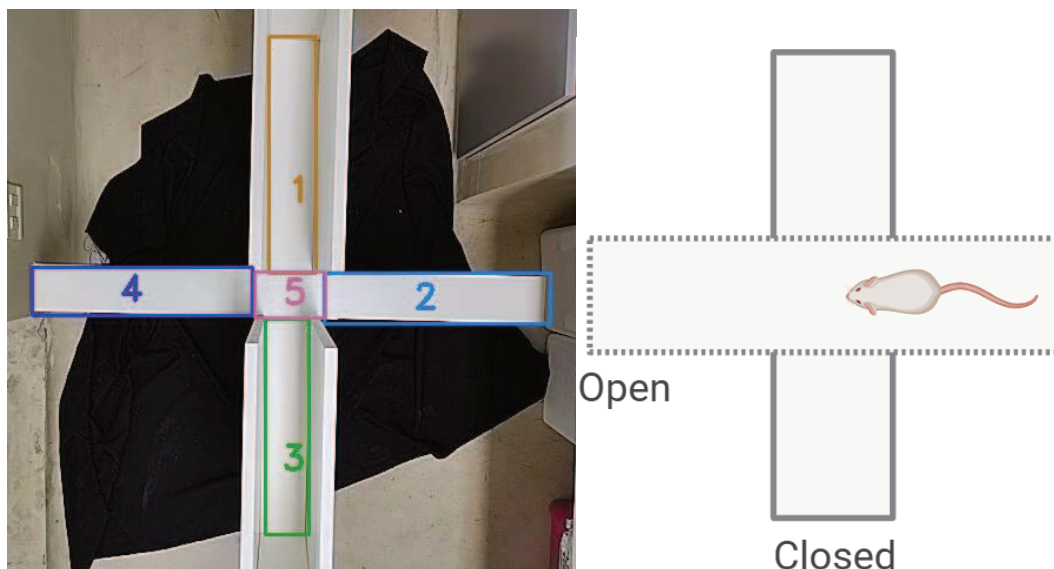
### Etapa II: Diseño e implementación del software RaTrack

El software, denominado RaTrack, fue desarrollado utilizando el lenguaje de programación Python, de libre acceso y multiplataforma que permite analizar automáticamente los videos de manera sencilla. RaTrack cuenta con una interfaz de línea de comandos que puede ejecutarse en consolas de Windows o Linux, y utiliza algoritmos de Procesamiento Digital de Imágenes para identificar y seguir a la rata en el video. Tras una serie de pruebas, el software fue optimizado para llevar a cabo los primeros análisis de videos.

Como se mencionó oportunamente en la metodología del test EPM, es de interés cuantificar los minutos que el animal pasó en los brazos cerrados o abiertos, el número de entradas en cada uno de los brazos y el tiempo en el centro del dispositivo.

Para utilizar RaTrack, primero se deben identificar los brazos abiertos y cerrados en la imagen plataforma utilizando el mouse para seleccionar las áreas que ocupan cada una de ellas (Figura 11). De esta manera, se delimitan las 5 secciones para que el programa sea capaz de detectar el movimiento y cuantificar el tiempo en que el animal se encuentra durante los 5 minutos de duración del test.

Se priorizó que la selección sea manual para adaptar mejor el campo seleccionado en base a la ubicación de la plataforma en la sala de evaluación. Esto se debe a que se realizó el test en diferentes días según los animales iban cumpliendo la edad estipulada y la plataforma debió ser movilizada de lugar. Para asegurar la exactitud de la selección se tomaron puntos de referencia de la plataforma como por ejemplo esquinas de los brazos abiertos o cerrados y superficie del piso de la plataforma.

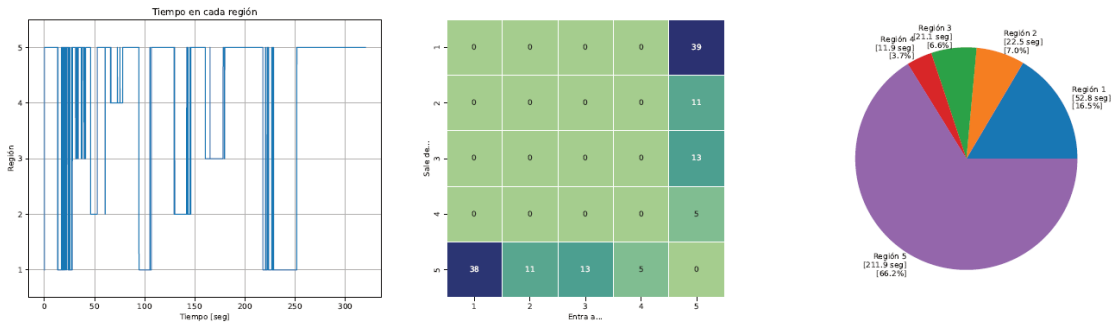


**Figura 11.** Imagen de la plataforma y la identificación de las 5 partes que analiza el test EPM. Brazos cerrados: 1 y 3; Brazos abiertos: 2 y 4; centro: 5. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

### Etapa III: Criterios de detección y análisis del comportamiento

El criterio utilizado por RaTrack para determinar la región donde se encuentra la rata busca emular el análisis manual. Durante el mismo, se considera que el animal pasa de una región a otra cuando coloca las cuatro patas sobre la nueva región. Sin embargo, resulta difícil reproducir este criterio en RaTrack (no es posible Identificar las patas con los algoritmos empleados), por lo que se tomó como criterio el porcentaje de píxeles de la rata en una dada región: el animal se encontrará una región cuando el porcentaje de píxeles de la rata supere un umbral especificado (por ejemplo, 90% de la rata está en un brazo abierto).

Sobre estos píxeles correspondientes a la rata en cada cuadro del video, se calcula la proporción de píxeles de la rata en cada región y la posición del centro de masas del conjunto de píxeles de la rata. Esta información se registra a lo largo del video. Posteriormente, RaTrack genera un informe que detalla la posición de la rata en el tiempo, la distancia recorrida, el IAn y la proporción de tiempo que el animal pasó en cada porción de la plataforma durante el experimento. Este reporte se almacena como una hoja de cálculos, generando gráficas que resumen la información analizada (Figura 12).



**Figura 12.** Reporte de resultados de RaTrack (de izquierda a derecha): Gráfico que indica el tiempo en segundos que el animal pasa en cada una de las 5 regiones; Gráfico que resume el número de entradas, salidas y dirección a cada una de las 5 regiones; Gráfico con el tiempo (segundos) y porcentaje en cada una de las regiones de la plataforma. Elaboración propia.

#### Etapa IV: Optimización de las condiciones de filmación

A lo largo de esta etapa, se implementaron diversas modificaciones orientadas a optimizar la calidad de las grabaciones y, en consecuencia, la precisión del análisis automatizado. En particular, se ajustaron las condiciones de la escena de filmación, incluyendo la iluminación, el color de fondo y el entorno de la plataforma. El área de fondo de la plataforma fue recubierta con color verde, mientras que el suelo de apoyo se cubrió con un material de color negro (Figura 13). Dado que las ratas utilizadas son de pelaje blanco, esta combinación de colores permitió maximizar el contraste entre los distintos planos de la imagen, mejorando la segmentación y el seguimiento del animal por parte del software. Estas modificaciones contribuyeron a obtener videos de mayor calidad mejorando la segmentación de las imágenes y, por ende, a incrementar la sensibilidad en la identificación automática de la posición y desplazamiento de los animales durante el ensayo.



**Figura 13.** Vista de la sala experimental utilizada para el test del laberinto en cruz elevado (EPM) tras la optimización de las condiciones de filmación.

#### Etapa V: Validación del análisis automatizado

Para validar la herramienta, se utilizaron los videos de los animales sometidos al test durante el experimento. Estos registros fueron analizados manualmente y mediante el software RaTrack por dos evaluadores independientes bajo un esquema de doble ciego. Con el objetivo de optimizar el proceso de validación, se seleccionaron tres de los parámetros más relevantes: el tiempo en el centro, en los brazos abiertos y en los brazos cerrados.

### **3.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS METABÓLICOS**

Las muestras de sangre troncal se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero. Las mismas fueron almacenadas a -50 °C hasta su análisis. Los metabolitos séricos (glucosa, triglicéridos y colesterol) se determinaron mediante ensayo utilizando un kit comercial (Wiener Labs, Argentina), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con un método espectrofotométrico (Boeco, Alemania) por duplicado. Los niveles de insulina se midieron utilizando un kit ELISA ultrasensible para insulina (Crystal Chem, Elk Grove Village, Illinois, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

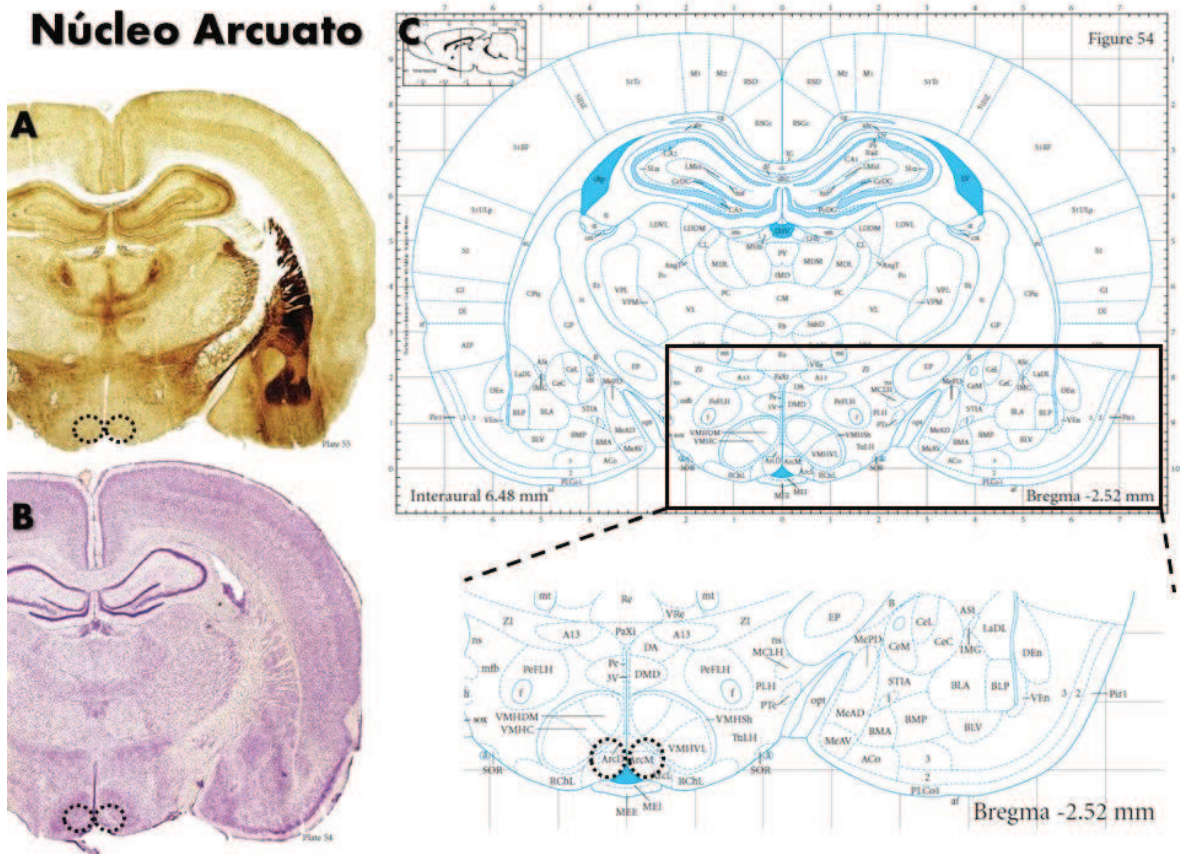
Las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas y se utilizaron para evaluar la resistencia a la insulina mediante el modelo de evaluación homeostática (HOMA-IR), calculado como [insulina en ayunas ( $\mu\text{U/ml}$ ) x glucosa en ayunas ( $\text{mmol/l}$ )]/ 22,5 (Matthews et al., 1985).

### **3.4 DETECCIÓN DE PRESENCIA DE ANTÍGENOS POR INMUNOFLORESCENCIA**

Se utilizó el ensayo de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de la proteína POMC en las neuronas de ARC (Bregma -2,5 mm) y de la proteína TH en VTA (Bregma - 6,8 mm), previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (Canesini et al., 2018; Schumacher et al., 2021). Los cerebros incluidos en parafina se seccionaron en cortes coronales ( $5\ \mu\text{m}$ ) utilizando un microtomo (Leica, Biosystems). Las secciones de los núcleos de interés se recogieron basándose en las coordenadas del atlas The Rat Brain (Paxinos & Watson, 2006). Los portaobjetos se secaron durante la noche a  $37\ ^\circ\text{C}$ , se desparafinaron en tres lavados de 5 minutos con reactivo Bioclear (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y se rehidrataron mediante una serie graduada de etanol (100 %, 96 %, 70 %) con lavados de 1 minuto en cada paso.

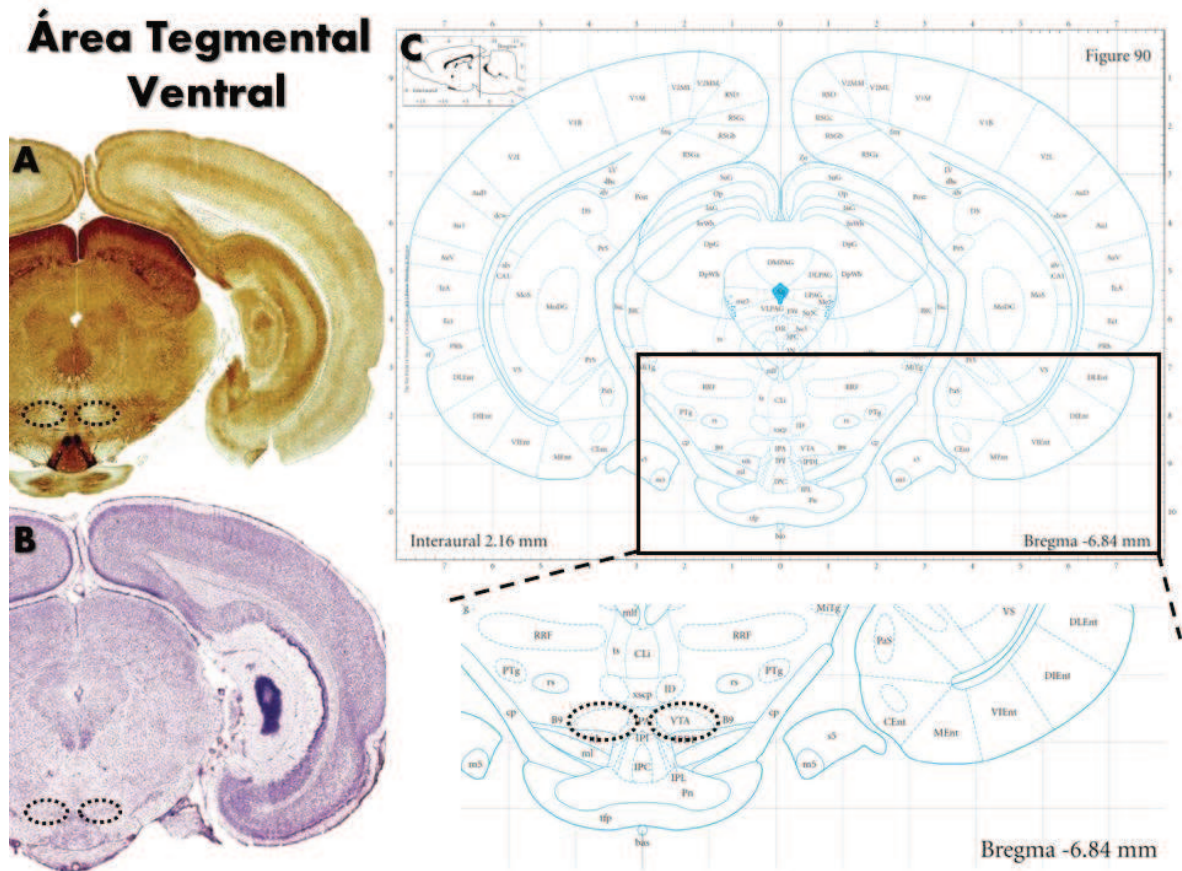
Para reducir la autofluorescencia del tejido, las secciones se incubaron con borohidruro de sodio ( $0,01\ \text{mg/ul}$ ; 40 min, temperatura ambiente). La unión de anticuerpos no específicos se bloqueó incubando las secciones con una solución de leche desnatada en polvo (Sigma-Aldrich) diluida en suero de caballo normal. La recuperación de antígenos se llevó a cabo incubando las secciones en citrato de sodio  $0,01\ \text{M}$  en un pretratamiento con microondas. A continuación, se colocaron en leche descremada en polvo (Sigma-Aldrich) con suero de cabra normal al 5 % (60 min, temperatura ambiente), para bloquear los sitios de unión de proteínas no específicas.

En ARC (Figura 14), se utilizó el anticuerpo primario anti-POMC (policlonal, conejo; Phoenix Pharmaceuticals Inc.) a una dilución de 1:1500 y se incubó durante la noche a  $4\ ^\circ\text{C}$ . Al día siguiente, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario fluorescente (Anti-conejo Alexa Fluor 488, Invitrogen) a una dilución de 1:250.



**Figura 14.** Ubicación neuroanatómica del Núcleo Arcuato (círculos negros) en cerebro de ratas utilizadas para los análisis de inmunohistoquímica de fluorescencia. (A) y (B) Cortes histológicos teñidos para acetilcolinesterasa y con violeta de cresilo, respectivamente. (C) Esquemas representativos de la zona de interés con las principales estructuras utilizadas como referencia para la correcta localización del área analizada. Imágenes adaptadas del atlas de Paxinos y Watson (2006).

En VTA (Figura 15), se utilizó anticuerpos primarios para TH (anticuerpo monoclonal, Millipore) a dilución 1/2000 (durante la noche, 4 °C) y luego se realizó la incubación con anticuerpos secundarios antimouse ALEXA 488 a 1/700 (1 h, temperatura ambiente). En ambos casos, para visualizar los núcleos celulares, se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 1/1000 (5 min, temperatura ambiente). Para los controles negativos, las secciones se procesaron sin el anticuerpo primario. Las imágenes de las secciones se registraron utilizando un microscopio confocal invertido Leica TCS SP8 y se procesaron con el software Leica Application Suite X (LAS X) (Leica Microsystems, 2024).



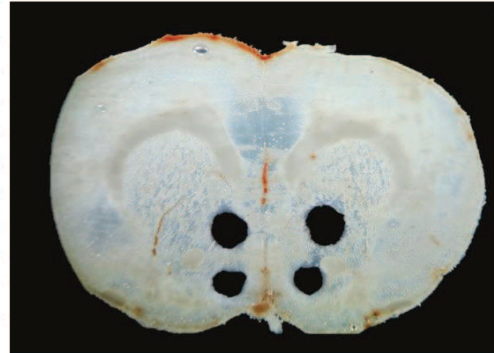
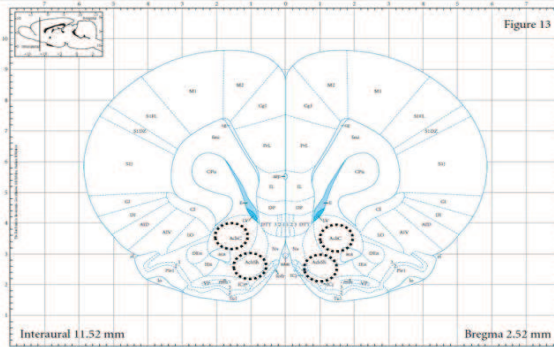
**Figura 15.** Ubicación neuroanatómica del Área Tegmental Ventral (círculos negros) en cerebro de ratas utilizadas para los análisis de inmunohistoquímica de fluorescencia. (A) y (B) Cortes histológicos teñidos para acetilcolinesterasa y con violeta de cresilo, respectivamente. (C) Esquemas representativos de la zona de interés con las principales estructuras utilizadas como referencia para la correcta localización del área analizada. Imágenes adaptadas del atlas de Paxinos y Watson (2006).

### 3.5 AISLAMIENTO DE NÚCLEOS CEREBRALES MEDIANTE TÉCNICA DE MICRODISECCIÓN

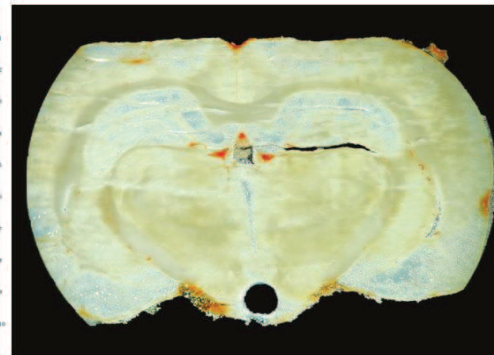
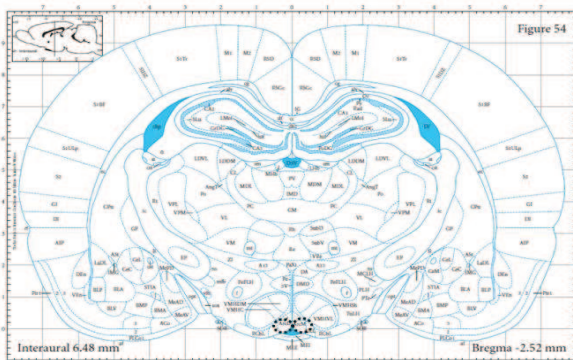
Los núcleos implicados en la vía dopaminérgica de la regulación hedónica de la ingesta de alimentos (NAcC, NAcSh y VTA) y el ARC clave de la regulación homeostática, se obtuvieron mediante la técnica de microdissección de Palkovits (1988), ya optimizada en nuestro laboratorio (Lazzarino et al., 2019; Schumacher et al., 2023). Imágenes mostrativas se visualizan en la Figura 16. Los cerebros congelados se incluyeron en Cryoplast (Biopack, Argentina) y se cortaron secciones coronales seriadas de 300  $\mu\text{m}$  en un criostato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En estas secciones, se extrajeron las regiones enriquecidas en los núcleos de interés utilizando agujas de micropunción de acero inoxidable de 0,5 y 1 mm, de acuerdo con el atlas estereotáxico The Rat Brain (Paxinos & Watson, 2006). Los núcleos se extrajeron bilateralmente y se almacenaron en TRIzol a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La topografía de los orificios se inspeccionó con un microscopio estereoscópico (Stemi 305, Zeiss, Oberkochen,

Alemania) para determinar la ubicación correcta de los núcleos microdisseccionados. Cada región cerebral microdisseccionada de un animal individual (entre 6 y 10 punciones, dependiendo de los núcleos cerebrales) se procesó y analizó como un único punto de datos por animal.

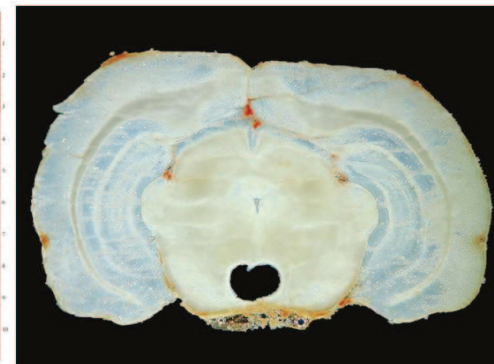
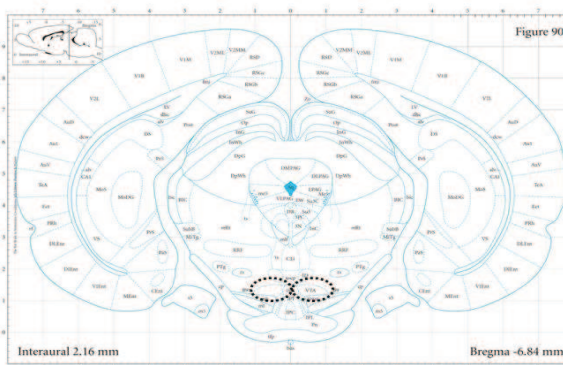
## Núcleo Accumbens



## Núcleo Arcuato



## Área Tegmental Ventral



**Figura 16.** Microdissección de núcleos cerebrales implicados en la regulación homeostática y hedónica de la ingesta de alimentos. A la izquierda, diagramas de cortes coronales de cerebro de ratona adaptados del atlas Paxinos y Watson (2006) (círculos negros delimitan áreas de interés). A la derecha, secciones coronales obtenidas en criostato mostrando los sitios de microdissección en los núcleos de interés mediante la técnica de microdissección de Palkovits (1988).

## 3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 3.6.1 Aislamiento de ARN y transcripción inversa

El ARN se aisló utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.) para evaluar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos.

La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito anteriormente (Schumacher et al., 2023). En resumen, del ARN total (0,5 µg) se transcribió inversamente en ADNc utilizando cebadores hexámeros aleatorios (200 pmol, Promega, Madison, WI, EE. UU.) y transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (200 unidades; Promega, Madison, WI, EE. UU.). A continuación, se añadieron inhibidor de ribonucleasa RNAout (20 unidades, Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina) y mezcla de desoxinucleótido trifosfato (100 nmol) a cada tubo de reacción con un volumen final de 30 µl de tampón de transcriptasa inversa 1X. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 90 min, a 42 °C durante 15 min y se detuvo calentando a 80 °C durante 5 min. Cada muestra se diluyó en agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 60 µL y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

### 3.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La RT-qPCR se realizó tal y como describió anteriormente nuestro grupo (Rossetti et al., 2016) utilizando un termociclador Real-Time PCR Step One Cyler (Applied Biosystems Inc., Life Technologies, California, EE. UU.) para la amplificación y cuantificación del ADNc. Se combinaron 5 µL de ADNc con HOTFIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Estonia) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen, EE. UU.) hasta un volumen final de 20 µL. La tabla 3 muestra los detalles de los pares de *primers* utilizados para la amplificación, diseñados previamente en nuestro laboratorio (Lazzarino et al., 2017; Rossetti et al., 2019; Schumacher et al., 2023).

Se utilizó la proteína ribosomal L19 como gen de referencia ya que no se observaron diferencias significativas en los valores Ct para L19 entre los grupos experimentales. La amplificación del ADNc se llevó a cabo por duplicado y se incluyeron controles negativos de molde de ADN. El ciclo umbral (Ct) y la eficiencia de la qPCR se calcularon utilizando el software Step One (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, EE. UU.).

La expresión de cada gen se calculó mediante el método de la curva estándar relativa (Rossetti et al., 2019). La cantidad relativa de cada gen *target* para todas las muestras experimentales se determinó a partir de la curva estándar, se normalizó con respecto a la

cantidad relativa del gen de referencia L19 y, finalmente, se dividió por el valor normalizado de la *target* de la muestra de control.

**Tabla 3.** Secuencia de *primers* usados en el estudio de la expresión de genes por PCRq.

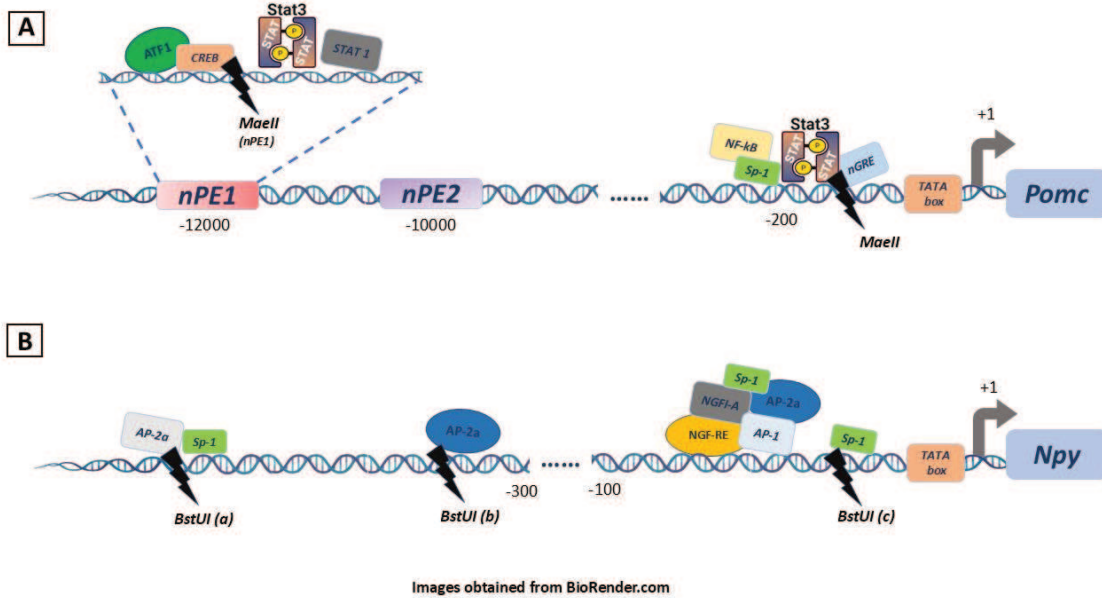
Proteínas	Nombre del gene	N° de acceso Genbank	Secuencia de primers	Tamaño (pb)
L19	<i>L19</i>	NM_031103.1	F: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' R: 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	99
POMC	<i>Pomc</i>	NM_139326.2	F: 5'-CCTCCTGCTTCAGACCTCCATA-3' R: 5'-TGTTTCATCTCCGTTGCCTGG-3'	159
CART	<i>Cart</i>	NM_017110.1	F: 5'-GCTCAAGAGTAAACGCATTCC-3' 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
InsR	InsR	NM_017071.2	F: 5'-TCTCTCCAGGAAACTACAGTGT-3' R: 5'-AAAATAGGTGGGTTCTGTCC-3'	80
GHSR	<i>Ghsr</i>	NM_032075.3	F: 5'-GCTCTGCAAACTCTTCCA-3' R: 5'-AAGCAGATGGCGAAGTAG-3'	99
TH	<i>Th</i>	NM_012740.3	F: 5'-TACCAAGATCAACCTACCGCC-3' R: 5'-GCTGAACTTCAACAGGGC-3'	118
DRD1	<i>Drd1</i>	NM_012546.3	F: 5'-TCCAAGGTGACCAATCTTT-3' R: 5'-GTTACAAAGGAGCCCAAAGG-3'	126
DRD2	<i>Drd2</i>	NM_012547.1	F: 5'-CCCCAGCAGGATGCAGAG-3' R: 5'-CAGGATGATGGGTGATGAAGA-3'	95
DAT	<i>Slc6a3</i>	NM_012694.2	F: 5'-CATCACCCTCCTACATCC-3' R: 5'-CATTGTGTTTGGATGAGGAGA-3'	89

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

### 3.7 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN

El estado de metilación de los promotores *Pomc* y *Npy* se llevó a cabo en ADN genómico aislado de ARC (n = 6/grupo). El análisis *in silico* de los sitios de metilación del ADN y los posibles sitios de unión de la transcripción en estos genes fue publicado anteriormente por nuestro grupo, incluyendo las regiones promotoras, las islas CpG, los sitios de restricción para enzimas sensibles a la metilación y los sitios de unión de factores de transcripción

(Lazzarino et al., 2017; Schumacher et al., 2021). La Figura 17 muestra un esquema de las regiones promotoras con islas CpG, sitios de corte para enzimas de restricción sensibles a la metilación y sitios de unión para factores de transcripción de los genes de interés.



**Figura 17.** Esquema de las regiones promotoras con islas CpG, sitios de corte para enzimas de restricción sensibles a la metilación y sitios de unión para factores de transcripción. A: regiones promotoras y potenciadoras (nPE1 y nPE2) del promotor del gen *Pomc*. B: promotor del gen *Npy*. Las figuras negras muestran los sitios de restricción Maell y BstUI. Elaboración propia utilizando elementos gráficos de BioRender.com.

El análisis de metilación se realizó utilizando una combinación de digestiones únicas con enzimas de restricción sensibles a la metilación (MSRE), seguidas de qPCR. En resumen, se digirió 1 µg de ADN con 1 unidad de Tail (Maell) (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE. UU.) a 60 °C o 10 unidades de BstUI (n.º de cat. R0518S. New England BioLab, Beverly, MA, EE. UU.) a 50 °C durante 1 hora en presencia del *buffer* enzimático 1X correspondiente. A continuación, el ADN se purificó utilizando el kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Se utilizó una región genómica sin sitios de restricción Maell o BstUI como control interno (CI) para evaluar la calidad del ADN. Cada muestra se cuantificó por duplicado o triplicado. Las secuencias de *primers* de qPCR utilizadas para analizar los diferentes sitios de restricción y el CI en cada promotor génico se muestran en la Tabla 4. Esta metodología fue descrita previamente por nuestro grupo (Rossetti et al., 2016; Schumacher et al., 2021, 2023).

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los análisis del estado de metilación de ADN.

Región de análisis	Oligonucleótido sentido (5' a 3')	Oligonucleótido antisentido (3' a 5')
<i>Pomc CI</i>	5'-GGTGAAGGCTGTCAGACAATC-3'	5'-CCAAACTCCAAGGGAAAGG-3'
<i>Pomc nPE1 Mae II (a)</i>	5'-TCAGACTGGTGGTACTGCTGGC-3'	5'-GGACTTCCTGGAGGTGCAGT-3'
<i>Pomc Mae II (b)</i>	5'-CAGGAAGGTCACGTCCAAGG-3'	5'-CCGTTTGGTCCCTGTCACTC-3'
<i>Npy CI</i>	5'-GTCCCTTGCTCAAAAGTGGC-3'	5'-CATCGGTCAAAACCTGGGTC-3'
<i>Npy BstUI (a)</i>	5'-TTCCAGAGGCATTAAGTCAAGC-3'	5'-AAAAGACCAACGCCACTGTG-3'
<i>Npy BstUI (b)</i>	5'-TCGCAGTTGTCCAGAGATG-3'	5'-GGACCGCTTAGATTGCCTGT-3'
<i>Npy BstUI (c)</i>	5'-GGAAGTGGCTGTGGGAGTCA-3'	5'-CTGCGAGGAATGAGCTCCAC-3'

*Pomc*: gen de la Proopiomelanocortina; nPE1: región potenciadora 1; *Npy*: gen del Neuropeptido Y. CI: control interno. *Mae II* or *BstUI*: Nombre de la enzima de restricción sensible a metilación utilizada.

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico incluyó evaluaciones de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Tras confirmar la normalidad de los datos, se realizó una detección de valores atípicos mediante la prueba Q de Dixon, y se excluyeron los puntos de datos que cumplieran los criterios estadísticos para el rechazo de valores atípicos ( $p < 0,05$ ).

Los parámetros de interés (peso corporal, peso corporal relativo e ingesta acumulada de alimentos/energía) desde el nacimiento hasta el DPN90 se analizaron con la prueba T de Student (datos paramétricos) o la prueba de Mann-Whitney (datos no paramétricos). Desde este punto hasta el DPN167, los parámetros evaluados (peso corporal, peso corporal relativo, IMC, parches adiposos, el IAd, parámetros metabólicos, ingesta acumulada de alimentos o energía, preferencia alimentaria, eficiencia calórica y la eficiencia alimentaria) se analizaron mediante ANOVA de dos vías y cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas, se realizó una prueba *post hoc* de Tukey o una prueba LSD de Fisher sin corregir para identificar las diferencias significativas entre los grupos.

Para investigar la selección de alimentos durante la exposición al CAF, se realizó un análisis de regresión lineal de la ingesta diaria (gramos) de cada tipo de alimento (dulce, salado y *pellet*) durante todo el período experimental. La pendiente de cada línea de regresión indica la dirección y la magnitud del cambio en el consumo a lo largo del tiempo (pendiente positiva: aumento de la ingesta; pendiente negativa: disminución de la ingesta). La significación estadística de las pendientes se evaluó mediante regresión lineal simple, y las diferencias entre las pendientes para los distintos tipos de alimentos (dulces, salados y pellets) se evaluaron mediante una prueba F. De la misma manera, se realizó un análisis de regresión

lineal para estudiar la ingesta semanal de energía o gramos, seguido de una comparación de pendientes con la prueba de Fisher.

La expresión relativa del ARNm y los niveles de metilación del ADN en el ARC se analizaron mediante ANOVA de dos vías y las comparaciones *post hoc* se realizaron mediante la prueba de Tukey o el LSD de Fisher sin corregir cuando se encontraron diferencias significativas.

Para la prueba SSS, se implementó la prueba ANCOVA, utilizando los grupos experimentales y la exposición a la solución (Pre Expuestos [P] y no Pre Expuestos [NP]) como factores, y el volumen de solución consumida durante la Pre Exposición como covariable. Cuando la prueba ANCOVA mostró una interacción significativa entre los factores, se llevó a cabo la prueba U de Mann-Whitney *post hoc*. Para analizar los datos de la prueba EPM, se realizaron un ANOVA de dos vías y *post hoc* de Tukey.

Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), con un nivel de significación establecido en  $p < 0,05$ . Para mejorar la claridad de la presentación de los resultados, la significación se indica con asteriscos en las curvas y con letras diferentes en las barras de los gráficos y las tablas. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Estas se determinaron basándose en comparaciones *post hoc* tras la prueba estadística adecuada. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales.

Los datos se analizaron utilizando RStudio 23.03.0 y se realizó un análisis de potencia a priori en R (RStudio Team, s. f.) siguiendo los parámetros de Cohen (1988). Suponiendo 12 animales por grupo, 4 niveles del factor principal,  $\alpha = 0,05$  y un efecto de tamaño moderado, la potencia estimada fue ligeramente superior a 0,80.

## 4 **RESULTADOS**

### 4.1 **EFFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN NEONATAL Y DE LA DIETA CAF SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS METABÓLICOS EN MACHOS**

#### 4.1.1 ***Variables morfométricas en machos***

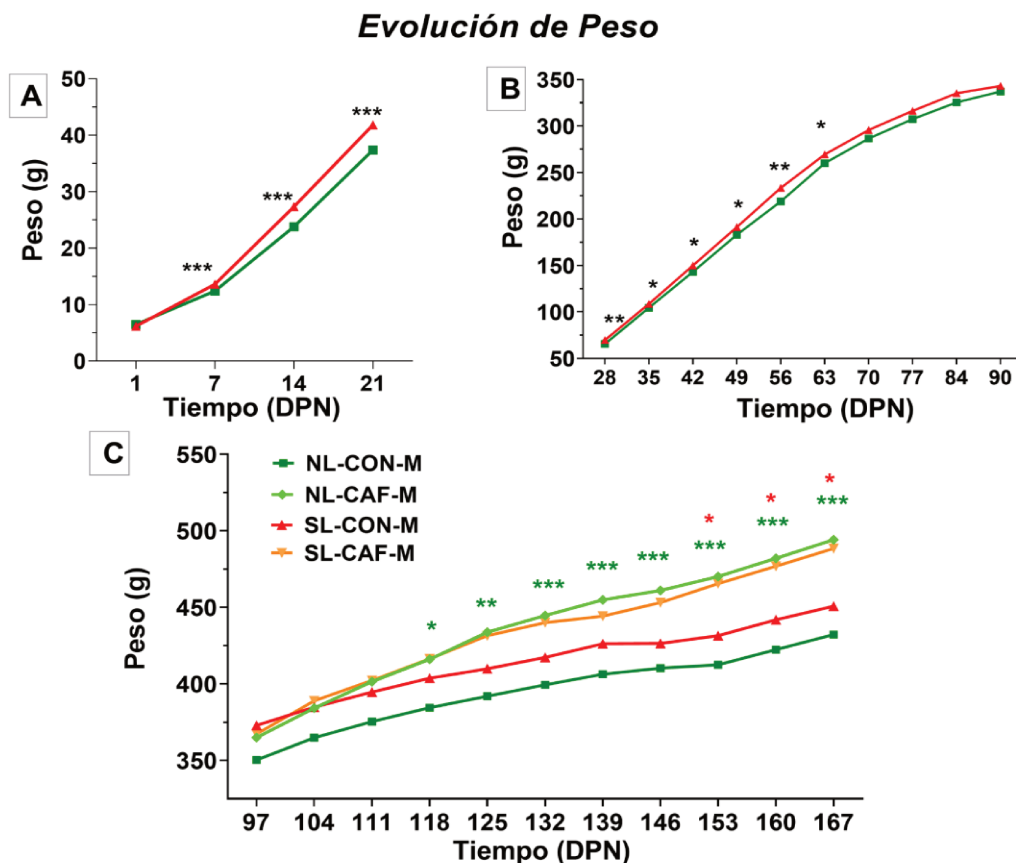
Con el fin de obtener una caracterización más exhaustiva de la composición corporal, se analizaron las variables de peso y talla utilizando distintos enfoques e indicadores.

##### 4.1.1.1 ***Peso corporal a lo largo del período experimental***

La evolución del peso corporal durante el periodo experimental se muestra en la Figura 18. Al inicio del estudio, no se observaron diferencias en el peso corporal entre los animales asignados a los diferentes grupos experimentales (DPN 4, Figura 18 A).

Para definir el modelo adecuadamente se corroboró una diferencia de peso corporal en el grupo SL superior al 10 % (Lazzarino et al., 2019). Teniendo en cuenta la ganancia de peso en este periodo, los animales SL presentan un aumento significativo tras una semana de vida ( $p=0.0008$ ) persistiendo esta diferencia en DPN 21 ( $p < 0.0001$ ) (Figura 18 A).

Tras el destete, los animales SL que luego recibieron pellet lograron igualar el peso respecto a los NL al llegar a la adultez (DPN 90) (Figura 18 B). Luego del desafío con dieta CAF, los animales que recibieron alimentos palatables presentaron mayor aumento de peso ( $p$  dieta=0.0135), independientemente de la sobrealimentación neonatal (Figura 18 C). Además, se observó una interacción significativa entre la dieta y el tiempo ( $p$  interac.  $= < 10^{-7}$ ), lo que indica un efecto específico del tipo de dieta sobre el peso a lo largo del periodo de administración de CAF. Tras 4 semanas de administración de dieta CAF, el grupo NL-CAF-M fue el primero en presentar un aumento de peso significativo (NL-CON-M vs. NL-CAF-M,  $p=0.0218$ ). En tanto el grupo SL-CAF-M recién logró el aumento significativo de peso respecto al control tras 9 semanas de administración de CAF (SL-CON-M frente a SL-CAF-M,  $p=0.0441$ ) (Figura 18 C).



**Figura 18.** Evolución del peso de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). (A) DPN 1 a 21 y (B) DPN 28 a 90 ( $n = 24 \pm 2$  por grupo). Los valores son medias  $\pm$  SEM según la prueba T de Student o Mann Whitney, \* con  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . (C) DPN 97 a 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Los valores representan medias  $\pm$  SEM. ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$ , \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Asteriscos negros indican diferencias entre NL y SL, asteriscos verdes muestran diferencias entre NL-CON-M y NL-CAF-M; los rojos entre SL-CON-M y SL-CAF-M. DPN: día posnatal.

#### 4.1.1.2 Peso relativo durante todo el periodo experimental

Otro parámetro analizado fue el peso corporal relativo, indicador útil para evaluar el estado nutricional. Representa una medida de la relación entre el peso (g) y la longitud (cm) de los animales. En la Tabla 5, se puede observar en DPN 21 un mayor peso relativo en los animales criados en camadas pequeñas ( $p < 0.0001$ ), como era de esperar para el modelo de camada reducida. Sin embargo, esta diferencia en el peso relativo no se observa en DPN 90 después de haber sido alimentados con dieta CON desde el destete (NL vs SL  $p > 0.05$ ).

Luego de una semana con dieta CAF, el peso relativo en los grupos experimentales permanece sin cambios, pero tras 11 semanas (DPN 167) los animales CAF presentaron mayor peso corporal relativo ( $p$  interac. = 0.0327; NL-CON-M vs. NL-CAF-M,  $p < 0.0001$ ; SL-CON-M frente a SL-CAF-M,  $p = 0.0414$ ). Por su parte, el grupo SL-CON-M mostró un mayor

peso corporal relativo en comparación con el grupo NL-CON al final del experimento ( $p=0.0203$ ) (Tabla 5). Esta diferencia causada por la sobrealimentación neonatal no se observó al evaluar el peso corporal de forma independiente.

**Tabla 5.** Peso relativo de machos

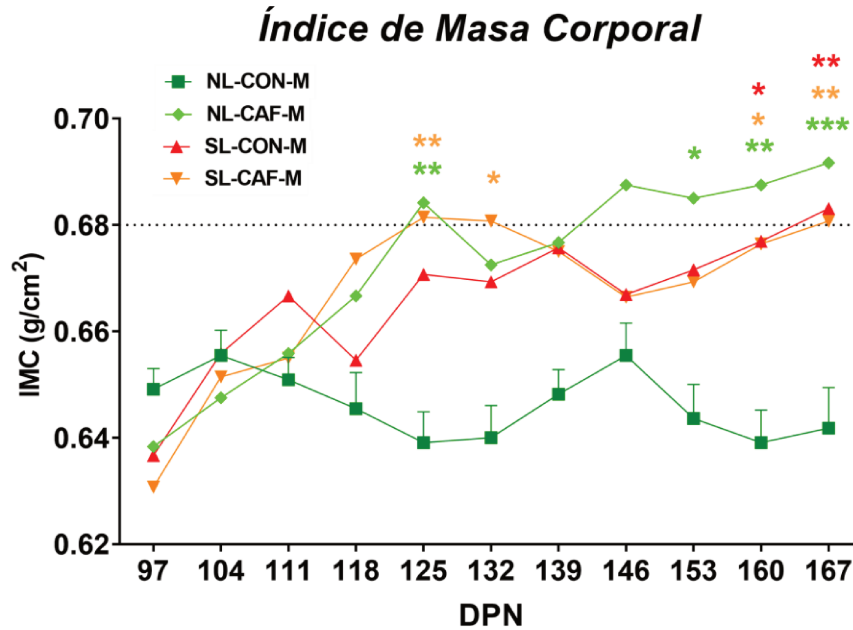
DPN	NL-CON-M	NL-CAF-M	SL-CON-M	SL-CAF-M	Análisis estadístico
21	3.407± 0.03 <sup>a</sup>	-	3.720±0.03 <sup>b</sup>	-	Test T: $p<0.0001$
90	14.59±0.10 <sup>a</sup>	-	14.59±0.19 <sup>a</sup>	-	Test T: ns
97	14.76±0.33 <sup>a</sup>	14.97±0.39 <sup>a</sup>	15.45±0.22 <sup>a</sup>	15.20±0.27 <sup>a</sup>	ANOVA de 2 vías: ns
167	16.66±0.21 <sup>a</sup>	18.48±0.17 <sup>c</sup>	17.53±0.23 <sup>b</sup>	18.24±0.33 <sup>c</sup>	ANOVA de 2 vías: p interc. = 0.0327 p dieta <0.0001

Peso relativo (relación peso corporal/tamaño (g/cm) de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducida (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias ± SEM (n = 12±2 por grupo). Test T o ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) y ns indica ausencia de diferencia estadística. DPN: día posnatal.

#### 4.1.1.3 IMC durante todo el periodo experimental

El IMC no constituye un parámetro fiable para evaluar la composición corporal en ratas al momento del destete, ya que durante esta etapa de crecimiento rápido las proporciones entre peso y longitud corporal no son lineales y reflejan principalmente el desarrollo somático más que la adiposidad. Por esta razón, se muestran los resultados IMC a partir de DPN 90.

Al final del experimento (DPN 167), el IMC fue significativamente mayor en todos los grupos tratados (NL-CAF-M, SL-CON-M y SL-CAF-M) en comparación con el grupo control (NL-CON-M). Además, los valores del IMC en estos grupos superaron el rango de referencia normal (0.45-0.68 g/cm<sup>2</sup>), lo que evidencia la presencia de obesidad (Novelli et al., 2007). Estos hallazgos indican el desarrollo de obesidad no solo después de 11 semanas de exposición a CAF, sino también en respuesta a la sobrealimentación en las primeras etapas de la vida ( $p$  interac. =0.0014;  $p$  dieta=0.0033;  $p$  sobrealimentación=0.0540) (Figura 19). En este punto, el grupo NL-CAF-M tuvo un IMC promedio más alto, aunque no fue estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ).



**Figura 19.** Evolución del índice de masa corporal (IMC) en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta cafetería (CAF) entre los días DPN 97 y 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$ , \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Asteriscos verdes muestran diferencias entre NL-CON y NL-CAF; negros entre SL-CON y SL CAF; naranjas indican las diferencias entre NL-CON y SL-CAF, y rojos diferencias entre NL-CON y SL-CON. La línea punteada muestra el umbral de obesidad. DPN: día posnatal.

#### 4.1.2 **Peso de parches de tejido adiposo en DPN167 en machos**

##### 4.1.2.1 Peso absoluto y relativo al peso corporal (TAE o TAP/100g)

En consonancia con el aumento de peso observado en los animales CAF, el tejido adiposo epididimal (TAE) en gramos mostró un mayor aumento de peso debido al efecto de la administración de la dieta CAF ( $p_{dieta} < 0.0001$ ). Además, el peso del tejido adiposo en relación con el peso corporal evidenció un efecto significativo de los factores evaluados ( $p_{dieta} < 0.0001$  y  $p_{sobrealimentación} = 0.0362$ ). En cuanto al tejido adiposo perirrenal (TAP) en gramos, se observó una interacción significativa entre la dieta y la sobrealimentación ( $p_{interac.} = 0.0306$ ; NL-CON-M vs. NL-CAF-M  $p < 0.0001$  y SL-CON-M vs. SL-CAF-M  $p = 0.0314$ ). El grupo SL-CON-M reflejó un peso del TAP superior al del grupo NL-CON-M al final del experimento ( $p = 0.0156$ ), lo que pone de relieve la sensibilidad de este parámetro para mostrar el efecto a largo plazo de la sobrealimentación neonatal. Al analizar el peso de este parche adiposo en relación con el peso corporal total, el grupo NL-CON-M reveló los valores más bajos ( $p_{dieta} = 0.0007$  y  $p_{sobrealim.} = 0.0555$ ) (Tabla 6).

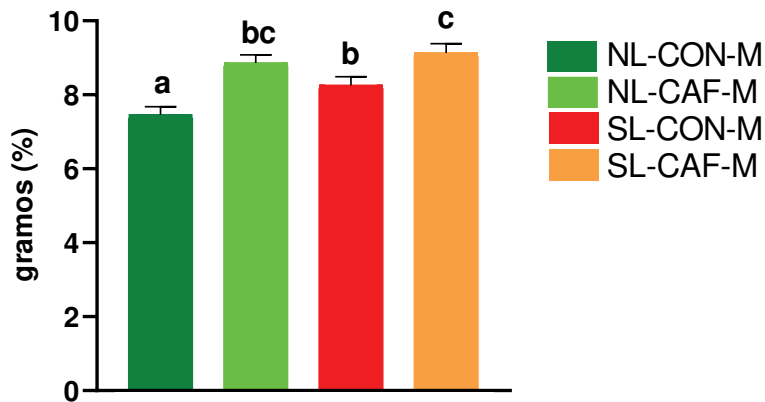
**Tabla 6.** Parches de tejido adiposo

Parámetro (DPN 167)	NL-CON-M	NL-CAF-M	SL-CON-M	SL-CAF-M	Análisis estadístico (ANOVA de 2 vías)
TAE (g)	13.75 ± 1.48 <sup>a</sup>	18.18 ± 1.62 <sup>b</sup>	15.04 ± 2.06 <sup>a</sup>	18.41 ± 2.88 <sup>b</sup>	p dieta<0.0001
TAE (g/100g de peso corporal)	3.12 ± 0.29 <sup>a</sup>	3.63 ± 0.29 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.30 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.42 <sup>b</sup>	p dieta<0.0001 p sobrealim.=0.0362 p interac. =0.0306
TAP (g)	19.07 ± 2.33 <sup>a</sup>	26.23 ± 3.35 <sup>c</sup>	22.41 ± 3.97 <sup>b</sup>	25.37 ± 4.20 <sup>c</sup>	p dieta<0.0001
TAP (g/100g de peso corporal)	4.34 ± 0.53 <sup>a</sup>	5.23 ± 0.58 <sup>b</sup>	4.94 ± 0.67 <sup>b</sup>	5.29 ± 0.60 <sup>b</sup>	p dieta=0.0007 p sobrealim.=0.0559

Peso (g) del tejido adiposo epididimal (TAE) o perirrenal (TAP) de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o camadas reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN 167. Los valores representan medias ± SEM (n = 12±2 por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes indican diferencia significativa (p < 0.05). DPN: día posnatal.

#### 4.1.2.2 Índice de adiposidad

El IAd permite valorar en su conjunto los parches adiposos en relación al peso corporal total. Este indicador se vio influenciado por la dieta, así como también por la sobrealimentación neonatal (p dieta<0,001; p sobrealimentación=0.0285). Como se muestra en la Figura 20, la exposición a la dieta CAF dio lugar a un IAd más alto en ambos grupos (NL-CAF-M: p=0.0013; SL-CAF-M: p=0.0402). Además, el grupo SL-CAF-M mostró un índice significativamente más alto en comparación con el grupo NL-CON-M (p< 0.0001) (Figura 20).



**Figura 20.** Índice de adiposidad (%) en ratas macho (M) criadas en camada normal (NL) o camada reducida (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) desde el DPN 90 al 167. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). DPN: día posnatal.

#### 4.1.3 Parámetros bioquímicos en DPN167 en machos

El nivel de glucosa en plasma se vio afectado por la dieta y la sobrealimentación neonatal ( $p$  dieta=0.0159;  $p$  sobrealimentación=0.0084). Cabe destacar que el grupo SL-CAF-M fue el único que presentó valores superiores a los valores normales de glucemia (110 mg/dL), demostrando una exacerbación del efecto de la sobrealimentación neonatal cuando se proporciona un estímulo hedónico (dieta CAF) en la edad adulta (Tabla 7).

En la Tabla 7 se muestra el efecto de la sobrealimentación neonatal en la glucemia. Valores cercanos a la significación estadística se observaron entre los grupos NL-CON-M vs. SL-CON-M ( $p=0.061$ ) y NL-CAF-M vs. SL-CAF-M ( $p=0.053$ ). Por el contrario de lo esperado, los niveles de triglicéridos circulantes se mantuvieron sin cambios, en tanto que el colesterol mostró una interacción significativa entre la dieta y la sobrealimentación ( $p$  interac.=0.0210), con niveles más bajos observados en el grupo SL-CAF-M (NL-CAF-M vs. SL-CAF-M,  $p=0.0133$ ; SL-CON-M vs. SL-CAF-M,  $p=0.0142$ ) (Tabla 7).

Como es de esperar, las concentraciones séricas de insulina se elevaron por la sobrealimentación neonatal ( $p$  sobrealim. = 0,0003) y/o por la dieta CAF ( $p$  dieta = 0,009) al final de la experiencia. La interacción mostró una tendencia hacia la significancia estadística ( $p$  interac. = 0,0764). En consecuencia, todos los grupos experimentales mostraron hiperinsulinemia en relación con NL-CON-M (NL-CAF-M,  $p = 0,0034$ ; SL-CON-M,  $p = 0,0003$ ; SL-CAF-M,  $p = <0,0001$ ) (Tabla 7).

Utilizando los valores de glucemia e insulinemia, se calculó el índice HOMA-IR para estimar la resistencia a la insulina (Tabla 7). Este siguió el mismo patrón observado para los niveles séricos de insulina, aumentando significativamente por la sobrealimentación neonatal ( $p$

sobrealim. = 0,0028) y/o la exposición a la dieta CAF ( $p$  dieta = 0,0026), mostrando una interacción casi significativa ( $p$  interac. = 0,0505). Esto indica una sensibilidad a la insulina deteriorada en todos los grupos (NL-CAF-M,  $p$  = 0,0009; SL-CON-M,  $p$  = 0,0010; SL-CAF-M,  $p$  = <0,0001), excepto NL-CON-M, siguiendo la tendencia observada en modelos similares.

**Tabla 7.** Parámetros bioquímicos en machos

Parámetro (DPN 167)	NL-CON-M	NL-CAF-M	SL-CON-M	SL-CAF-M	Análisis estadístico (ANOVA de 2 vías)
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	99.89 ± 3.80 <sup>a</sup>	108.18 ± 4.27 <sup>ab</sup>	109.01 ± 1.92 <sup>b</sup>	117.18 ± 2.70 <sup>c</sup>	$p$ dieta=0.01 $p$ sobrealim.=0.008
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	101.43 ± 5.09 <sup>a</sup>	106.47 ± 1.96 <sup>a</sup>	105.61 ± 4.20 <sup>a</sup>	90.1 ± 4.56 <sup>b</sup>	$p$ interac. =0.0210
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	259.46 ± 7.68 <sup>a</sup>	266.33 ± 12.21 <sup>a</sup>	293.43 ± 6.68 <sup>a</sup>	273.3 ± 14.68 <sup>a</sup>	ns
<b>Insulinemia (<math>\mu</math>U/ml)</b>	13.06 ± 1.925 <sup>a</sup>	43.05 ± 12.30 <sup>b</sup>	53.89 ± 8.72 <sup>b</sup>	61.51 ± 7.718 <sup>b</sup>	$p$ dieta=0.0099 $p$ sobrealim.=0.0003
<b>HOMA-IR</b>	3.12 ± 0.38 <sup>a</sup>	13.87 ± 4.25 <sup>b</sup>	13.96 ± 1.66 <sup>b</sup>	17.34 ± 2.55 <sup>b</sup>	$p$ diet=0.0026 $p$ sobrealim.=0.0028

Nivel de metabolitos plasmáticos en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o camadas reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN 167. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n$  = 12 $\pm$ 2 por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes en negro indican diferencia significativa ( $p$  < 0.05), en rojo indican valores cercanos a la significación estadística (entre  $p$  0.05 y 0.08), ns indica ausencia de diferencia estadística. DPN: día posnatal.

#### 4.1.4 Efectos de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF sobre la ingesta de alimentos en machos

##### 4.1.4.1 Ingesta acumulada en DPN 90 y 167 (en g y kcal)

La Tabla 8 muestra la ingesta acumulada de alimentos en energía (kcal) o masa (gramos). Después del destete y hasta el DPN 90, ninguno de los dos parámetros se vio afectado por la sobrealimentación neonatal ( $p$ >0.05). Durante la prueba con el estímulo hedónico de la dieta CAF, estos animales consumieron más energía que los alimentados con la dieta CON ( $p$  dieta<0.0001; NL-CON-M vs. NL-CAF-M  $p$ =0.0002; SL-CON-M vs. SL-CAF-M  $p$ =0.0186), lo que evidencia el efecto de la dieta hipercalórica administrada. Sin embargo, los animales CAF consumieron menos gramos de alimento que los CON ( $p$  dieta=0.0001).

**Tabla 8.** Ingesta acumulada en energía (kcal) y masa (gramos).

Parámetro	DPN	NL-CON-M	NL-CAF-M	SL-CON-M	SL-CAF-M	Análisis estadístico
Ingesta acumulada (kcal)	28-90	3780 ± 130.4 <sup>a</sup>	-	4061 ± 70.88 <sup>a</sup>	-	Test T: ns
Ingesta acumulada (g)		1262 ± 43.48 <sup>a</sup>	-	1354 ± 23.63 <sup>a</sup>	-	Test T: ns
Ingesta acumulada (kcal)	97-167	5050 ± 28.40 <sup>a</sup>	6674 ± 118.2 <sup>b</sup>	5136 ± 23.46 <sup>a</sup>	6115 ± 368.6 <sup>b</sup>	ANOVA de 2 vías: p dieta <0.0001
Ingesta acumulada (g)		1683 ± 9.47 <sup>ac</sup>	1504 ± 34.22 <sup>ab</sup>	1712 ± 7.818 <sup>c</sup>	1412 ± 83.15 <sup>b</sup>	ANOVA de 2 vías: p dieta =0.0001

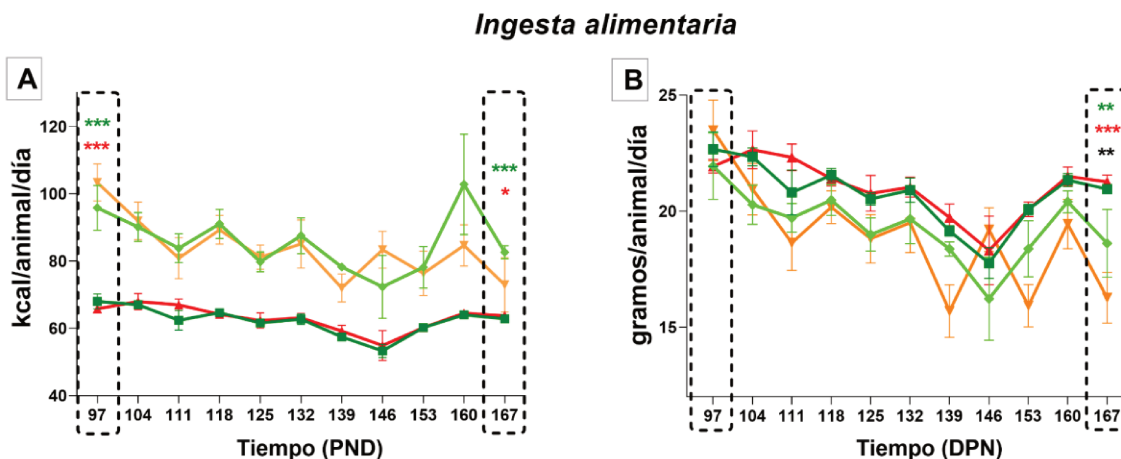
Ingesta acumulada de alimentos (en kcal o gramos) desde el día posnatal (DPN) 28 al 90 y del 97 al 167 de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducida (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias ± SEM (n = 12±2 por grupo). Test T (NL vs. SL, DPN 28-90). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey (NL-CON-M, SL-CON-M, NL-CAF-M, SL-CAF-M, DPN 97-167). Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05). DPN: día posnatal.

#### 4.1.4.2 Ingesta de alimentos en DPN 97 y 167

Tras una semana de dieta CAF (DPN 97), se observó un aumento significativo de la ingesta energética en NL-CAF-M y SL-CAF-M (p<0.001) en comparación a sus respectivos controles, evidenciando un claro efecto de la dieta administrada (p dieta<0.001) (Figura 21 A). En este punto, no hay diferencias entre los grupos en el consumo en masa (g) de alimentos (p>0.05) (Figura 21 B).

Tras 11 semanas de dieta CAF (DPN 167), la energía consumida también se vió afectada por el tipo de dieta administrada (p<0.001), siendo los grupos CAF los de mayor consumo energético (NL-CON-M vs. NL-CAF-M p<0.001; SL-CON-M vs. SL-CAF-M p=0.02). No se observaron diferencias en este parámetro en los animales alimentados con dieta CON (NL-CON-M vs. SL-CON-M, p>0.05) (Figura 21 A). En cuanto a los gramos consumidos, se evidenció una interacción entre la sobrealimentación y el tipo de dieta administrada (p interact. =0.01; p dieta<0.001; p sobrealimentación=0.05) (Figura 21 B). En este parámetro, los animales CAF volvieron a presentar un consumo de gramos inferior al de los controles (NL-CON-M vs. NL-CAF-M, p=0.004; SL-CON-M vs. SL-CAF-M, p<0.001, respectivamente).

Se observó una conducta hipofágica en el grupo SL-CAF-M evidenciada por el menor consumo de gramos de alimentos CAF ( $p=0.003$ ).

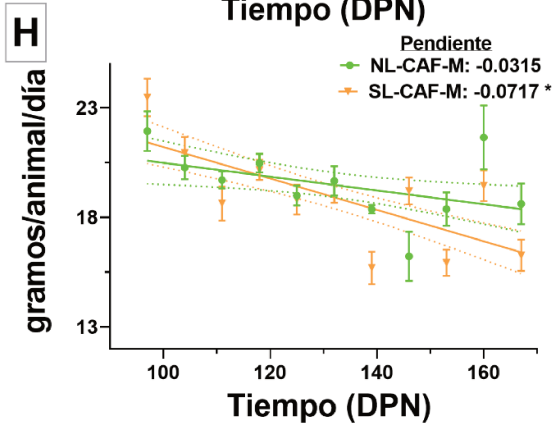
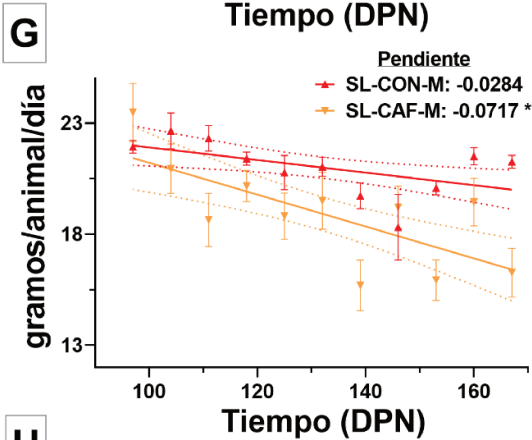
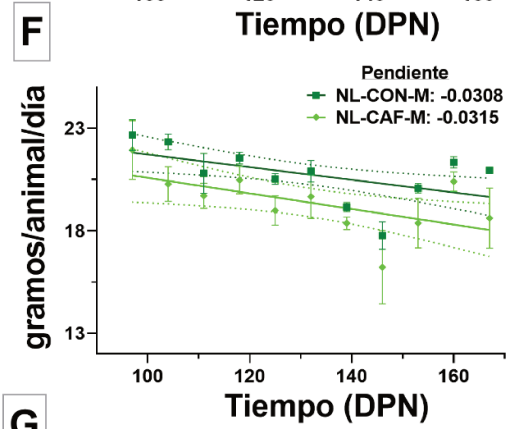
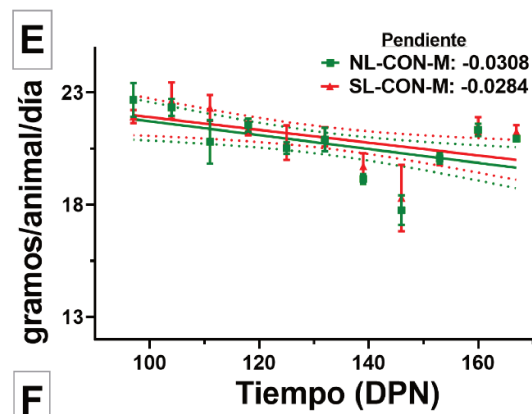
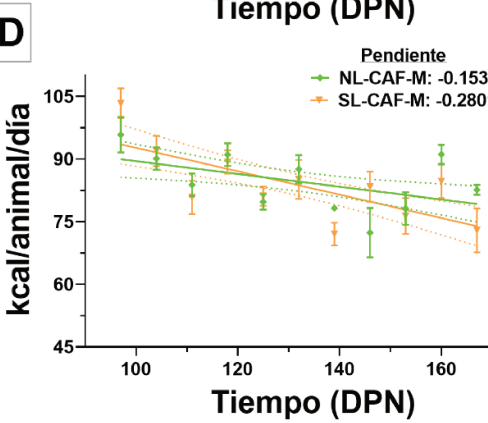
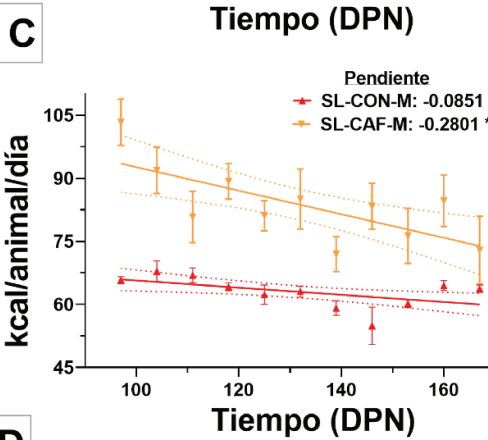
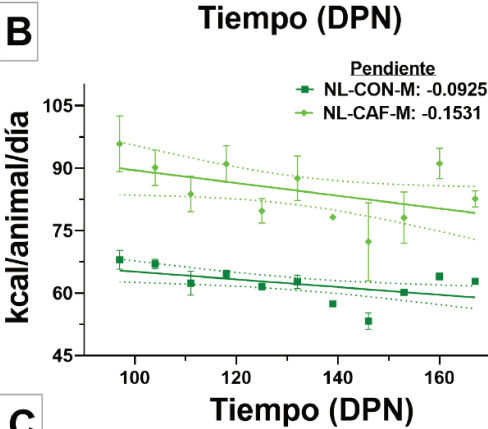
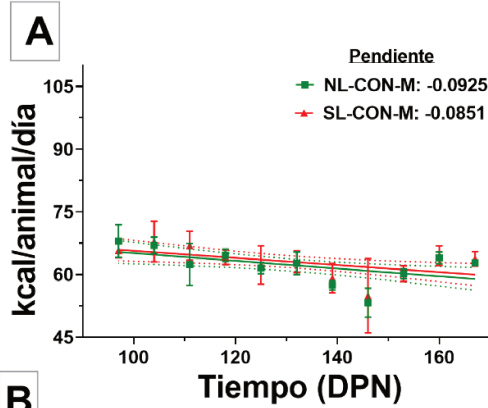


**Figura 21.** Ingesta alimentaria en (A) energía y (B) masa / día en DPN 97 y 167, de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher en DPN 97 y 167. \* verde indica diferencias entre NL-CON-M y NL-CAF-M; en rojo se indican diferencias entre SL-CON-M y SL-CAF-M; en negros las diferencias entre NL-CAF-M vs. SL-CAF-M. DPN: día posnatal.

#### 4.1.4.3 Progresión de la ingesta de alimentos en DPN 97 a 167

El análisis de la ingesta a lo largo del tiempo evidenció un patrón de consumo (en energía y masa) constante entre los grupos NL-CON-M y SL-CON-M ( $p > 0.05$ ) a lo largo del periodo experimental (Figura 22 A y E). El mismo patrón se observó en los animales NL (NL-CON-M vs. NL-CAF-M,  $p > 0.05$ ) (Figura 22 B y F). Por su parte, SL-CON-M y SL-CAF-M mostraron una disminución progresiva en la ingesta de energía y masa (hipofagia), caracterizada por una pendiente más pronunciada ( $p=0.0288$  y  $p=0.0330$  respectivamente) (Figura 22 C y G). Los grupos que recibieron dieta CAF no mostraron diferencias entre las pendientes al comparar el consumo de energía (NL-CAF-M vs. SL-CAF-M,  $p>0.05$ ) (Figura 22 D). Sin embargo, se observó una disminución progresiva en la ingesta de masa (hipofagia) en SL-CAF-M vs. NL-CAF-M ( $p=0.0234$ ) (Figura 22 H).

## Progresión de la ingesta alimentaria



**Figura 22.** Progresión de la ingesta alimentaria en kcal (A, B, C) o gramos (D, E, F) al día, desde DPN 97 hasta 167 de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducida (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias  $\pm$  SEM (n = 12 $\pm$ 2 por grupo). Regresión lineal y comparación de pendientes con la prueba de Fisher. \* Indica una diferencia significativa (p<0.05). DPN: día posnatal.

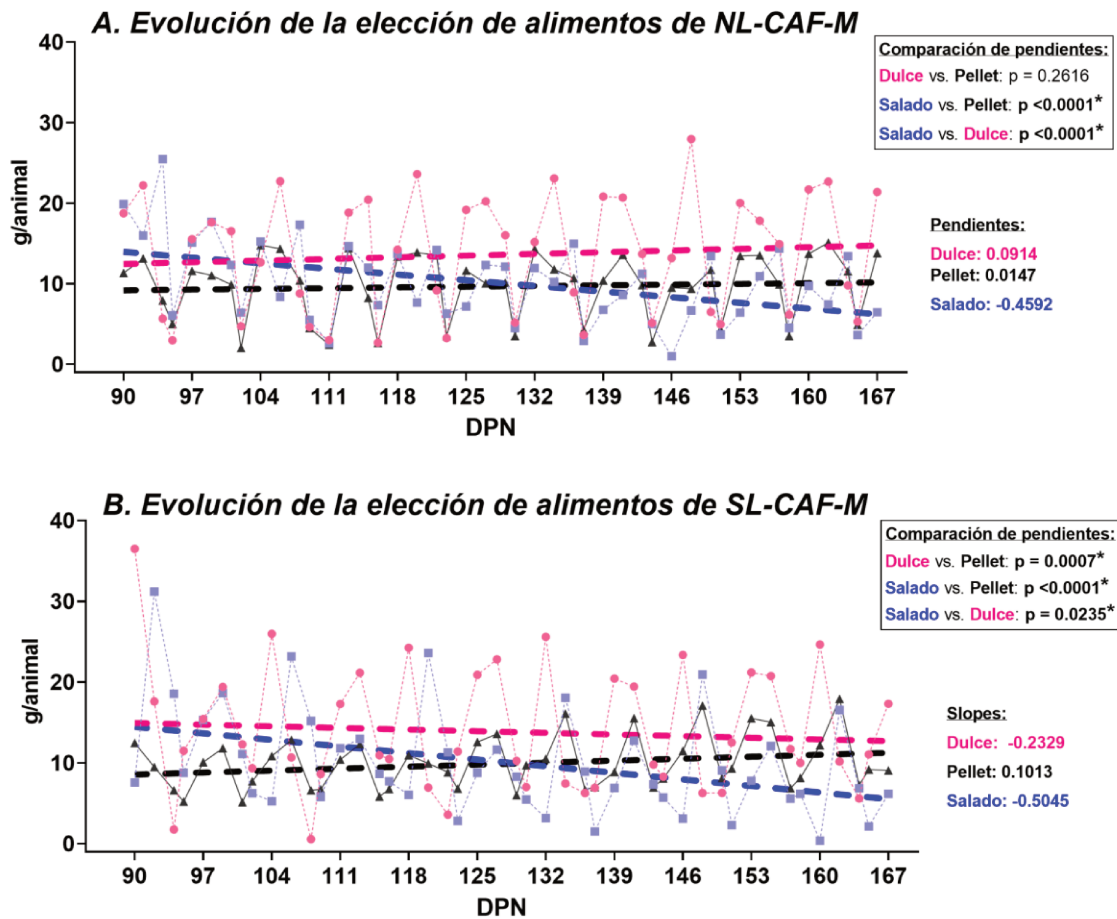
#### 4.1.4.4 Curva de ingesta de alimentos dulces, salados y pellet durante el desafío con dieta CAF

Con el fin de evaluar la elección de los alimentos CAF en el tiempo se cuantificó la ingesta de acuerdo a los alimentos dulces, salados y pellet a lo largo de todo el periodo experimental (Figura 23).

Al analizar el consumo del grupo NL-CAF-M a lo largo del tiempo, fue posible observar un patrón de consumo estable de los alimentos dulces (línea punteada rosa; Pendiente: 0.0914; p=0.1053) y pellet (línea punteada negra; Pendiente: 0.0147; p = 0.7125), mientras que se observó una disminución progresiva en la ingesta de alimentos salados (línea punteada azul; Pendiente: -0.4592; p < 0.0001) (Figura 23 A). El análisis comparativo de las pendientes de las curvas mostró diferencias entre los alimentos salados y dulces (p <0.0001) y entre los alimentos salados y pellet (p <0.0001). No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de los alimentos dulces y pellet (p= 0.2616) (Figura 23 A).

Por otro lado, el grupo SL-CAF-M mostró un patrón de disminución del consumo de alimentos dulces (línea punteada rosa; Pendiente: -0.2329; p=0.0145) y salados (línea punteada azul; Pendiente: -0.5045; p <0.0001) a lo largo del tiempo, acompañado de un aumento progresivo en la ingesta de pellet (línea punteada negra; Pendiente: 0.1013; p=0.0001) (Figura 23 B). Al evaluar las pendientes de las curvas, la ingesta de pellet aumentó significativamente en comparación con los alimentos dulces (p=0.0007) y salados (p <0.0001). Además, el consumo de alimentos salados mostró una disminución más pronunciada con el tiempo que el consumo de alimentos dulces (p= 0.0235) (Figura 23 B).

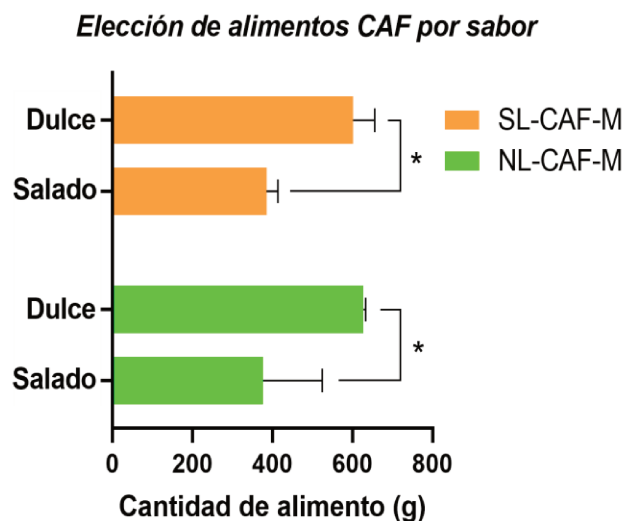
Por otra parte, en el análisis entre los grupos mostró que los SL-CAF-M presentaron una disminución más pronunciada en el consumo de alimentos dulces que los NL-CAF-M (p=0.0065). Paradójicamente, el consumo de pellet aumentó en el tiempo en los SL-CAF en comparación con los NL-CAF-M (pendiente NL-CAF-M: 0.01477; pendiente SL-CAF-M: 0.1013; p = 0.0541), indicando una preferencia relativa de los animales SL-CAF-M por la ingesta de pellets frente al resto de los alimentos.



**Figura 23.** Evolución de la elección de alimentarias CAF (g/animal) a lo largo del tiempo, en machos (M) criados en A. Camada normal (NL) B. Camada reducida (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). DPN 97 a 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Regresión lineal y comparación de pendientes con prueba F. \* Indica una diferencia significativa  $p < 0.05$ . Las líneas punteadas muestran las tendencias de ingesta a lo largo del tiempo. DPN: día posnatal.

#### 4.1.4.5 Ingesta acumulada de alimentos por sabores (dulce y salado)

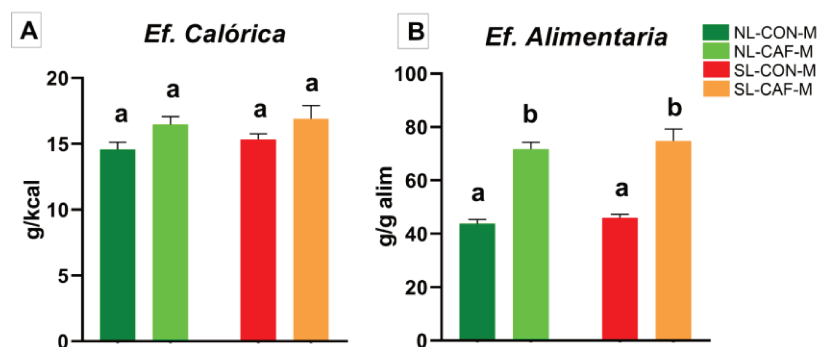
En relación al sabor de los alimentos CAF (dulce o salado), los NL y SL optaron más por los alimentos dulces que por los salados ( $p < 0.004$ ). En tanto que, los alimentos ingeridos (dulces o salados) en gramos, no presentaron diferencias entre los grupos experimentales ( $p > 0.05$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Elección de alimentos CAF por sabor en relación a la ingesta acumulada (g) durante 11 semanas en ratas macho (M) criadas en camada normal (NL) o camada reducida (SL), alimentadas con dieta de cafetería (CAF). Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey. \* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.4.6 Eficiencia calórica y eficiencia alimentaria

En otra parte del análisis del comportamiento alimentario, se examinó la eficiencia calórica (EC) y alimentaria (EA) (Figura 25). El EC (ganancia de peso/ingesta energética) aumentó a causa del efecto de la dieta CAF ( $p = 0.0208$ ), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 25 A). Por su parte, la EA (ganancia de peso/gramos de alimentos) aumentó significativamente en ambos grupos CAF ( $p < 0.0001$ ) (Figura 25 B). En conjunto, los resultados muestran que la dieta CAF promovió una mayor eficiencia metabólica, independientemente del estado nutricional neonatal.



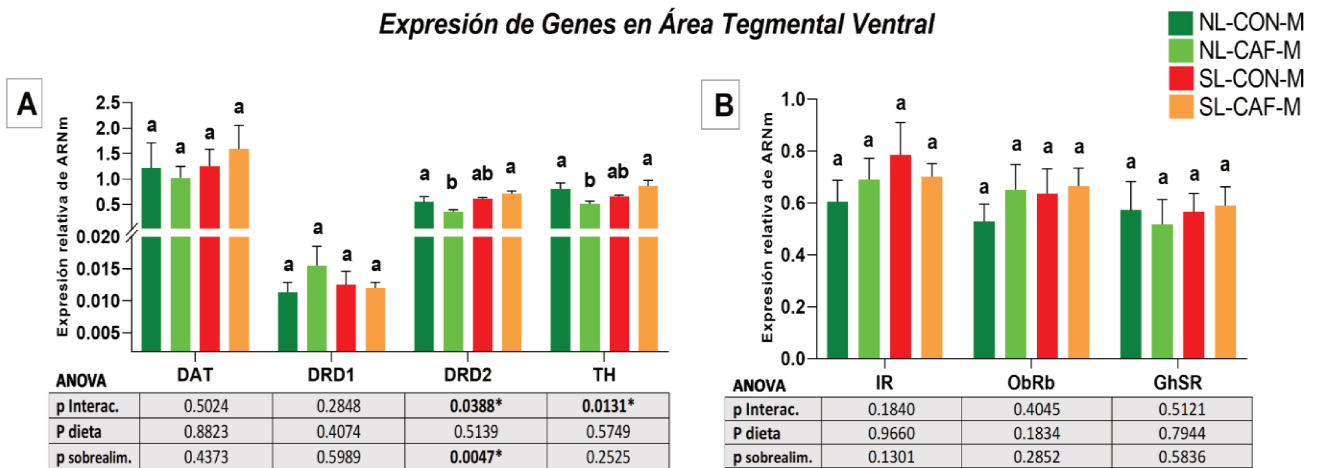
**Figura 25.** Eficiencia calórica (A) y alimentaria (B) en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL), alimentadas con dieta control (CON) o cafetería (CAF) desde el DPN 90 al 167. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . DPN: día posnatal.

#### 4.1.5 Efectos de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF sobre la regulación hedónica de la ingesta en machos

##### 4.1.5.1 Expresión de los principales genes involucrados en la vía dopaminérgica mesolímbica

Se evaluó la expresión del ARNm de los genes en diferentes núcleos en el DPN 167, para determinar si la sobrealimentación neonatal y/o la dieta CAF en la adultez influyen en el control hedónico de la ingesta de alimentos (Figuras 26 y 27). El VTA, el NAcSh y el NAcC fueron los núcleos de interés para investigar el mecanismo molecular del circuito dopaminérgico mesolímbico.

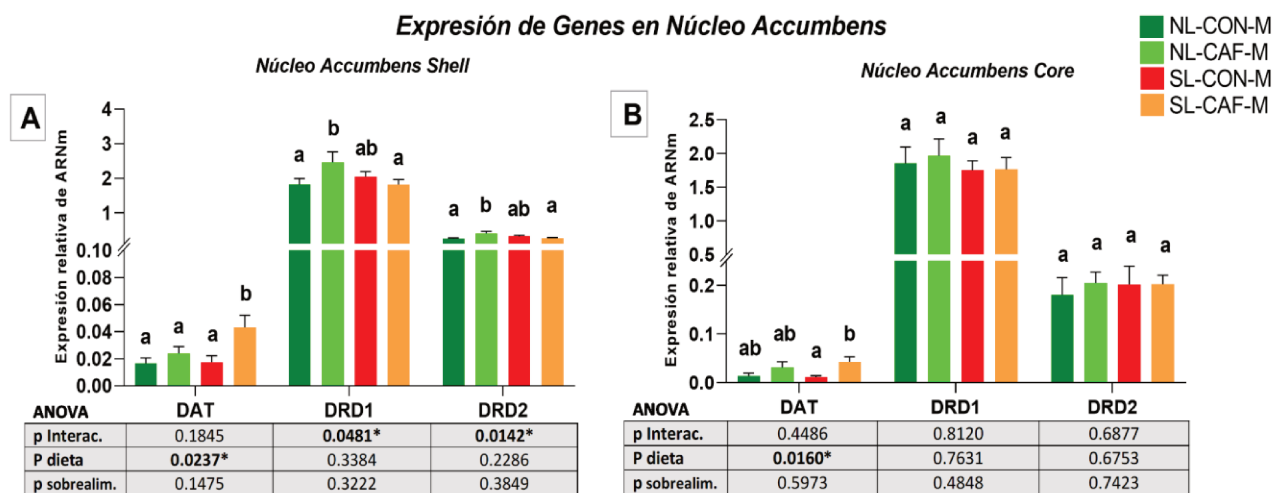
En VTA, donde se encuentran los cuerpos de las neuronas dopaminérgicas, observamos una interacción entre la sobrealimentación neonatal y la dieta CAF ( $p$  interac. = 0.0131) en la expresión del ARNm de la enzima responsable de la síntesis de DA. NL-CAF-M presentó los niveles más bajos de expresión de ARNm de TH en comparación con NL-CON-M ( $p$  = 0.0335) y SL-CAF-M ( $p$  = 0.0485), como se muestra en la Figura 26 A. Se observaron resultados similares para la expresión de ARNm DRD2 ( $p$  interac. = 0.0388;  $p$  sobrealim. = 0.0047), con una menor expresión de este gen en los animales NL-CAF-M en comparación con los SL-CAF-M ( $p$  = 0.0009) (Figura 26 A). Por otra parte, la expresión del ARNm de DRD1, DAT (Figura 26 A) y los receptores hormonales (insulina, leptina y ghrelina; Figura 26 B) no mostraron diferencias en este núcleo.



**Figura 26.** Niveles relativos de ARNm de genes de interés en área tegmental ventral en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN167. (A) TH, tirosina hidroxilasa; DRD1, receptor de dopamina D1; DRD2, receptor de dopamina D2; DAT, transportador activo de dopamina; VTA, área tegmental ventral. (B) *InsR*: receptor de insulina; *Ob-Rb*: receptor de leptina; *Ghsr*: receptor de ghrelina. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n$  = 5-6 por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* LSD de Fisher. Diferentes letras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

Los cuerpos celulares dopaminérgicos en el VTA envían proyecciones a NAcSh y NAcC. En el NAcSh, los niveles de ARNm de DAT se vieron afectados por el tipo de dieta administrada ( $p$  dieta = 0.0237) y los niveles más altos de ARNm de DAT se observaron en la SL-CAF. Por otro lado, el DRD1 y el DRD2 se vieron influenciados por la interacción entre la sobrealimentación neonatal y el tipo de dieta en la vida adulta ( $p$  interac. = 0.0481 y 0.0142, respectivamente), como se muestra en la Figura 27 A. Tanto en DRD1 como en DRD2, los niveles más altos de expresión de ARNm se hicieron evidentes en NL-CAF-M, siendo significativamente diferentes de los grupos NL-CON-M y SL-CAF-M ( $p$  = 0.0412 y  $p$  = 0.0392 para DRD1;  $p$  = 0.0134 y  $p$  = 0.0175 de DRD2, respectivamente) (Figura 27 A).

En NAcC, se observó una relación entre el tipo de dieta administrada y los niveles de expresión de DAT ( $p$  dieta = 0.0160). Los niveles de ARNm de DAT en SL-CAF-M fueron significativamente más altos que en SL-CON-M ( $p$  = 0.0320), como se muestra en la Figura 27 B. Por último, la expresión de DRD1 y DRD2 en este núcleo no se vió alterada por los factores evaluados (Figura 27 B).



**Figura 27.** Niveles relativos de ARNm de genes de interés en Núcleo Accumbens (A) *Shell* y (B) *Core* en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN167. DRD1: receptor de dopamina D1; DRD2: receptor de dopamina D2; DAT: transportador activo de dopamina. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n$  = 5-6 por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* LSD de Fisher. Diferentes letras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

#### 4.1.5.2 Inmunofluorescencia de tirosina hidroxilasa (TH) en el área tegmental ventral (VTA)

La presencia de la proteína TH en el VTA se determinó mediante inmunofluorescencia, realizada de manera representativa de un animal por grupo experimental (Figura 28). Para

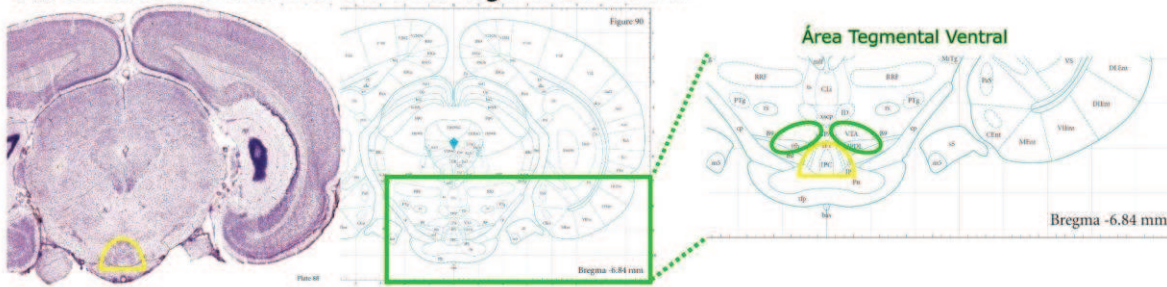
identificar, anatómicamente la región de interés se utilizó el Atlas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2006) y para el ensayo de la técnica de inmunofluorescencia se seleccionó una sección histológica representativa de VTA (Bregma -6,84). Para localizar la estructura de interés, se identificó la región peduncular (de forma semicircular, delineada en amarillo). Además, se localizaron otras estructuras clave, como la región que rodea el núcleo del rafe, caracterizada por su histoarquitectura cónica o en forma de pera invertida con la cavidad central del acueducto (Sylvius) que constituye el vestigio del tercer ventrículo. Por último, en la zona apical se diferenciaron los dos hemisferios cerebrales separados, cuyo centro está delimitado histológicamente por los vestigios del cuerpo calloso (forceps major corpus callosum) (Figura 28 A).

Observamos la presencia de inmunomarcación positiva para TH en células del área correspondiente al VTA en secciones histológicas del cerebro de los cuatro grupos experimentales. La positividad se visualizó con fluorescencia verde en el citoplasma de las células de forma redondeada características de las neuronas dopaminérgicas.

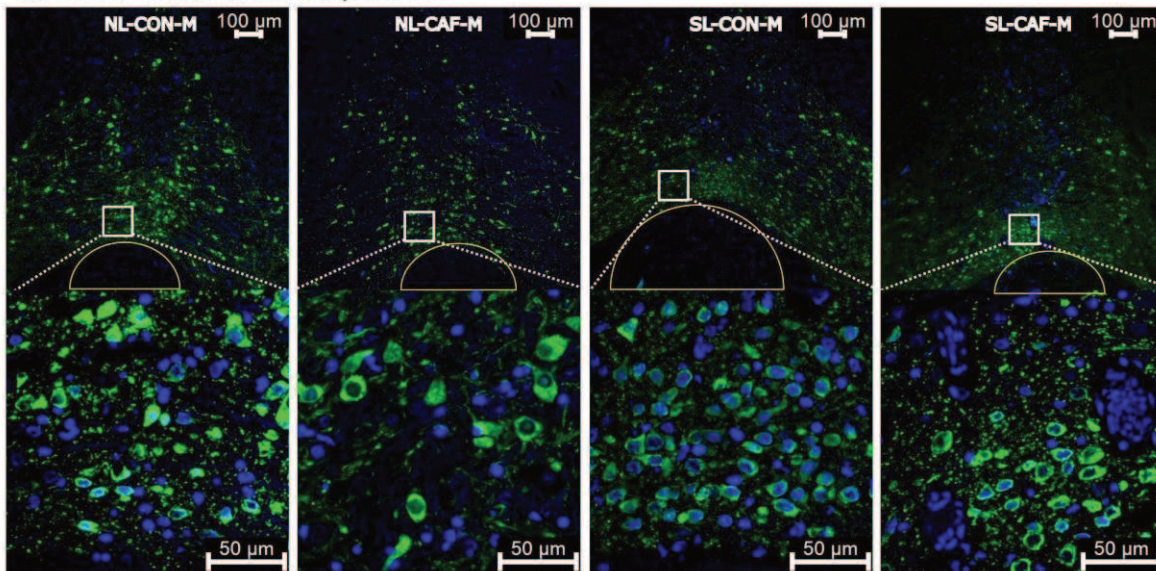
El análisis cualitativo reveló que el grupo NL-CAF-M presentó un patrón atenuado de inmunotinción para la proteína TH en la región específica de VTA, consistente con los cambios observados a nivel de ARNm, sugiriendo una posible reducción en la población de células dopaminérgicas en dicha área (Figura 28 B).

## Immunofluorescencia para TH en VTA

### A. Ubicación anatómica del área tegmental ventral



### B. Immunofluorescencia para TH



**Figura 28.** Immunofluorescencia para tirosina hidroxilasa en área tegmental ventral. (A) Ubicación anatómica del área tegmental ventral en el atlas del sistema nervioso de Paxinos y Watson (2006). (B) Imágenes representativas de la tinción por inmunofluorescencia, paneles superiores son imágenes panorámicas y los inferiores muestran una ampliación del área delimitada (rectángulo blanco) de la proteína TH en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducida (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN167. TH, tirosina hidroxilasa; VTA, área tegmental ventral (delimitada en verde) y región peduncular (delimitada en amarillo). DPN: día posnatal.

### 4.1.6 Impacto de la sobrealimentación temprana y de la dieta CAF sobre el sistema homeostático de regulación de la ingesta

#### 4.1.6.1 Expresión de genes implicados en la regulación hipotalámica de la ingesta en ARC

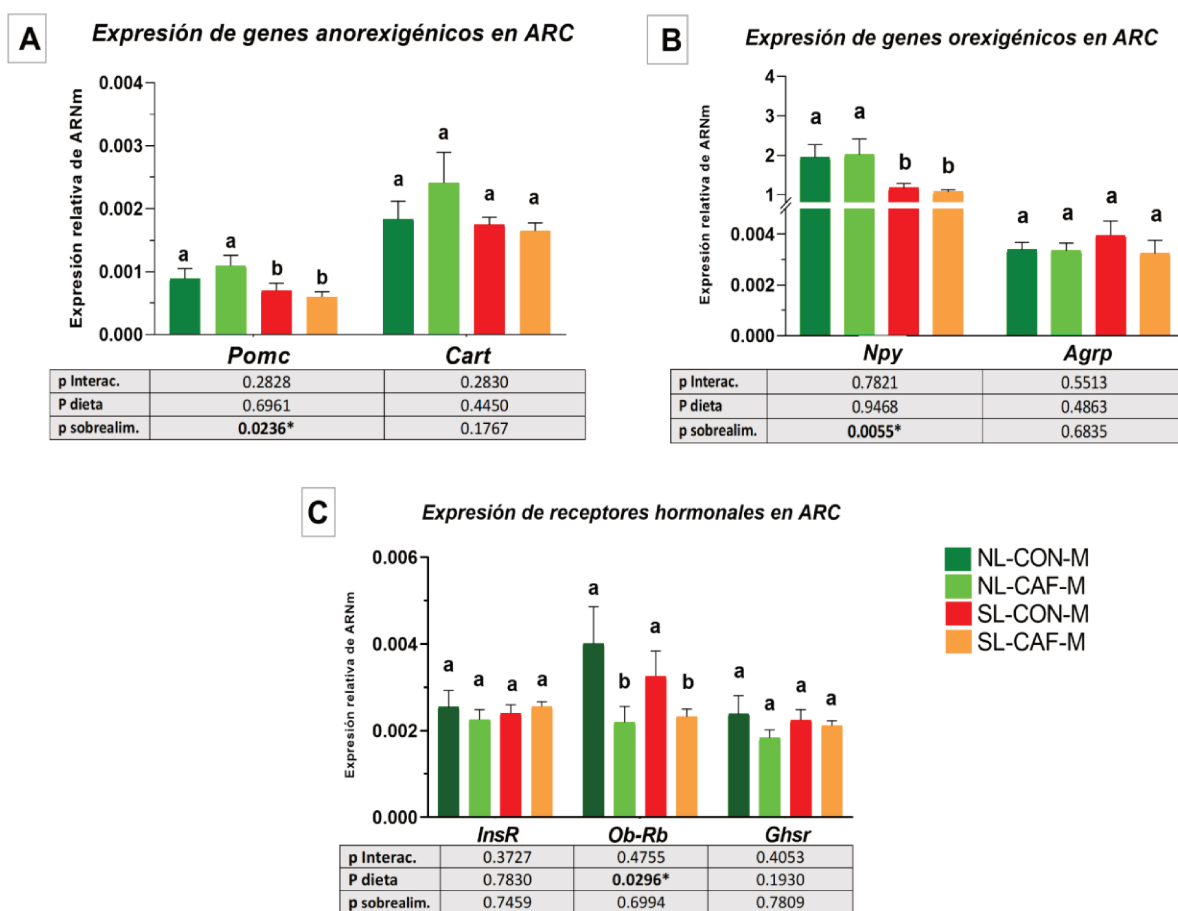
Para estudiar el impacto de los factores estudiados en el control homeostático de la ingesta de alimentos, también se evaluó la expresión de ARNm de neuropéptidos clave y receptores hormonales en el ARC en el DPN167.

En cuanto a los neuropéptidos anorexígenos, la sobrealimentación neonatal produjo una regulación a la baja de la expresión de *Pomc* ( $p$  sobrealim. = 0.0236). Por el contrario, la

expresión de *Cart* no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0.05$ ) (Figura 29 A).

El análisis de los neuropéptidos orexigénicos mostró que la sobrealimentación neonatal redujo la expresión de NPY en el ARC al final de la experiencia ( $p$  sobrealim. =0.0101). No se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de AgRP ( $p > 0.05$ ) (Figura 29 B).

En cuanto a las señales periféricas del estado energético, la expresión de *InsR* no mostró cambios significativos en los niveles de ARNm, mientras que la expresión de *Ob-Rb* disminuyó en respuesta a la dieta CAF ( $p$  dieta=0.0296). Los niveles de ARNm de *Ghsr* no se vieron afectados de manera significativa ( $p > 0.05$ ) (Figura 29 C).



**Figura 29.** Niveles relativos de ARNm de genes de interés en Núcleo Arcuato de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN167. (A) *Pomc*: Proopiomelanocortina; *Cart*: Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas. (B) *Npy*: neuropéptido Y; *AgRP*: Proteína relacionada con el Agouti; (C) *InsR*: receptor de insulina; *Ob-Rb*: receptor de leptina; *Ghsr*: receptor de ghrelina. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 5-6$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* LSD de Fisher. Diferentes letras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

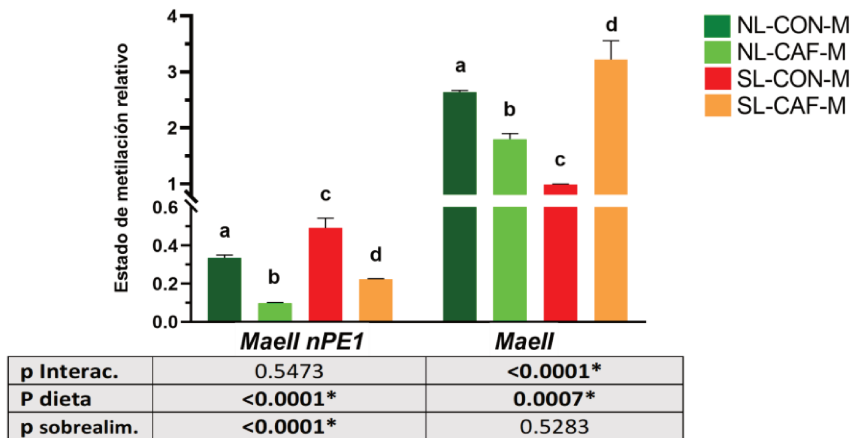
4.1.6.2 Estado de metilación del ADN en regiones promotoras de *Pomc* y *Npy*

Para investigar si la expresión alterada del ARNm de *Pomc* y *NPY* en el ARC está relacionada con la regulación epigenética, evaluamos el estado de metilación de sus regiones reguladoras. Los promotores y las regiones reguladoras de *NPY* y *Pomc* se denominaron según las enzimas de restricción sensibles a la metilación utilizadas (*Maell* o *BstUI*).

El patrón de metilación del ADN de las regiones *Pomc* mostró un aumento del nivel en el sitio *Mae II* de la región potenciadora *nPE1* que puede relacionarse con la dieta CAF y la sobrealimentación en las primeras etapas de la vida ( $p$  dieta  $<0.0001$ ;  $p$  sobrealim.  $<0.0001$ ). Los animales SL-CON-M mostraron niveles de metilación más altos en comparación con NL-CON-M ( $p = 0.0005$ ), y SL-CAF-M exhibió un aumento de la metilación en relación con NL-CAF-M ( $p = 0.0034$ ) (Figura 30). La hipermetilación en el potenciador en animales SL-CON-M puede explicar la reducción de la expresión del ARNm de *Pomc*, lo que indica un efecto duradero de la sobrealimentación neonatal sobre este *endpoint*.

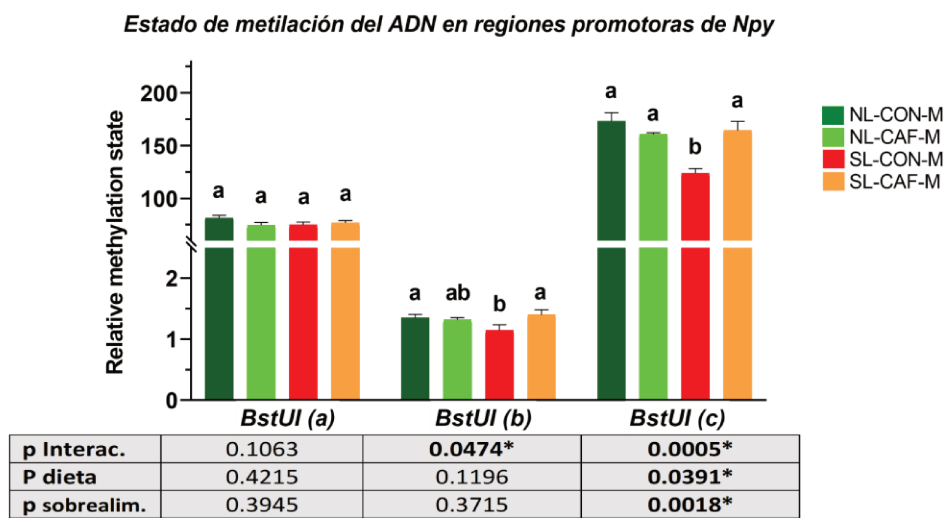
El área cercana a la caja TATA aguas abajo del promotor mostró una interacción significativa entre la dieta y la sobrealimentación neonatal ( $p$  interac.  $<0.0001$ ;  $p$  dieta  $=0.0007$ ). Concretamente, los animales SL-CAF-M mostraron mayores niveles de metilación cerca del promotor en comparación con todos los demás grupos (respecto a NL-CON-M,  $p = 0.0286$ ; NL-CAF-M y SL-CON-M,  $p <0.0001$ ) (Figura 30). La mayor metilación del promotor parece estar asociada con una supresión aún mayor de *Pomc*, lo que refleja el impacto combinado de las condiciones nutricionales tempranas y tardías.

**Estado de metilación del ADN en regiones promotoras de *Pomc***



**Figura 30.** Análisis de metilación del promotor *Pomc* en el Núcleo Arcuato utilizando enzimas de restricción sensibles a la metilación y qPCR. Ratas machos (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con una dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN167. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 6$  por grupo). *Maell nPE1* indica el potenciador del promotor del gen *Pomc* y *Maell* refiere al promotor del gen *Pomc*. Se estudiaron los sitios *target* CG para la digestión por la enzima de restricción sensible a la metilación *Maell*. ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes indican  $p <0,05$ . DPN: día posnatal.

El estado de metilación de sitios específicos de NPY se muestra en la Figura 31. En BstUI (A), los niveles de metilación del ADN no se vieron afectados por los factores evaluados ( $p > 0.05$ ). Por el contrario, en el sitio BstUI (B), se observó una interacción entre la dieta y la sobrealimentación neonatal ( $p$  interac. = 0.0474), y los animales SL-CON-M mostraron un nivel de metilación más bajo (frente a NL-CON-M,  $p = 0.0496$  y SL-CAF-M,  $p = 0.0179$ ). Se observó un patrón similar en el sitio BstUI (C) ( $p$  interac. = 0.0005;  $p$  dieta = 0.0391;  $p$  sobrealim. = 0.0018), donde SL-CON-M mostró una metilación significativamente reducida en comparación con todos los demás grupos (frente a NL-CON-M,  $p < 0.0001$ ; NL-CAF-M,  $p = 0.0006$  y SL-CAF-M,  $p = 0.0002$ ). Estos resultados no explican directamente la reducción de la expresión del ARNm del *Npy* detectada en estos animales (Figura 31).



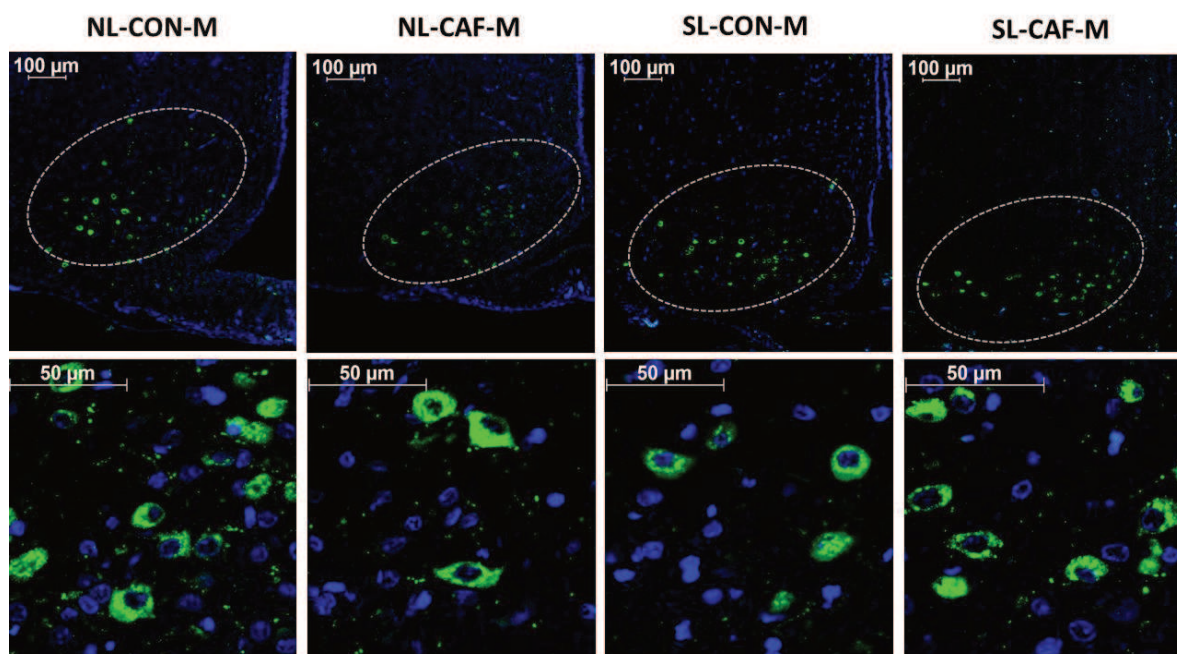
**Figura 31.** Análisis de metilación del promotor *Npy* en el núcleo arcuato utilizando enzimas de restricción sensibles a la metilación y qPCR. Ratas machos (M) criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL) y alimentadas con una dieta control (CON) o de cafetería (CAF) en DPN167. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 6$  por grupo). Promotor del gen *Npy*. Se estudiaron los sitios *target* CG para la digestión por la enzima de restricción sensible a la metilación BstU I. ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . DPN: día posnatal.

#### 4.1.6.3 Inmunofluorescencia de POMC en ARC

Para evaluar la expresión de la proteína codificada por el gen *Pomc*, se realizó una marcación por inmunofluorescencia en zonas del ARC (Bregma -2.5), representativa a los grupos experimentales (Figura 32). La localización anatómica del ARC se determinó siguiendo las referencias del Atlas del Cerebro de Rata (Paxinos y Watson, 2006). El ARC se identificó basándose en su posición ventromedial típica, bordeando el tercer ventrículo y subyacente a la eminencia media. Se detectaron células inmunopositivas para POMC en esta región en

todos los grupos experimentales, mostrando una fluorescencia citoplasmática verde consistente con el fluoróforo utilizado para su detección. Estos hallazgos confirman la presencia de la proteína en la región donde se realizaron los análisis de expresión génica aunque la inmunohistoquímica cualitativa no reveló diferencias claras entre los grupos (Figura 32).

### ***Inmunofluorescencia para POMC en ARC***



**Figura 32.** Inmunofluorescencia para la proteína POMC en el ARC de ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en el DPN167. Los paneles superiores muestran imágenes representativas panorámicas y los paneles inferiores muestran una ampliación de la zona. DPN: día posnatal. POMC: proopiomelanocortina; ARC: núcleo arcuato (delimitado en blanco).

#### **4.1.7 Test conducta**

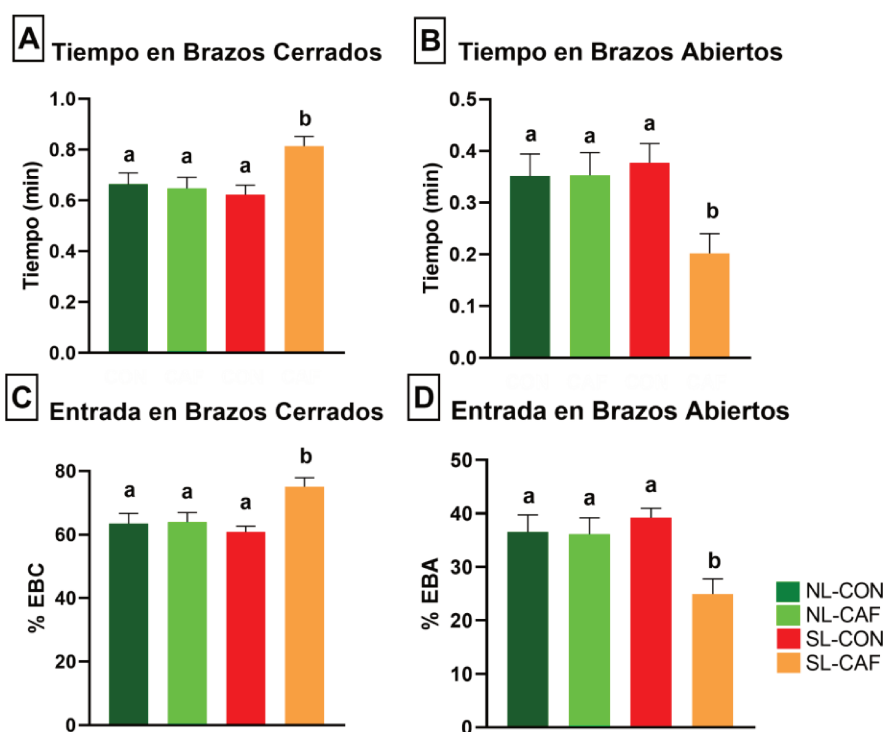
##### **4.1.7.1 Test del Laberinto Elevado en Cruz**

Para estudiar el comportamiento similar a la ansiedad mediante el test del Laberinto elevado en cruz, se evaluó el tiempo (minutos) que el animal pasa en los brazos cerrados (TBC), en los brazos abiertos (TBA), en los brazos cerrados (TBC), las entradas en los brazos cerrados (EBC) y en los brazos abiertos (EBA) en DPN 130 y en los brazos cerrados (EBC). El TBA mostró una interacción entre factores ( $p$  interac. = 0.0324,  $p$  dieta = 0.0358), los animales SL-CAF-M pasaron menos TBA en comparación con los SL-CON-M ( $p$  = 0.0104), lo que indica un aumento de la ansiedad (datos no mostrados). Lo mismo se observó en TBC mostró una interacción entre los factores analizados ( $p$  interact.= 0.0113,  $p$  dieta=0.0340). Además, este comportamiento se reflejó en un TBC más bajo en el grupo SL-CON-M que en el grupo SL-CAF-M ( $p$ =0.0035), patrón que también se observó en NL-CAF-M en comparación con

los animales SL-CAF-M ( $p=0.0277$ ) (Figura 33 A). El TBA mostró una interacción entre factores ( $p$  interac. = 0.0324,  $p$  dieta = 0.0358), los animales SL-CAF-M pasaron menos TBA en comparación con los SL-CON-M ( $p = 0.0104$ ), lo que indica un aumento de la ansiedad (Figura 33 B).

Al analizar el porcentaje del número de entradas en los brazos cerrados (EBC), se detectaron resultados consistentes con los parámetros descritos anteriormente ( $p$  interact.=0.0134,  $p$  dieta=0.0089). Los animales SL-CAF-M realizaron más EBC que los SL-CON-M ( $p=0.0011$ ) y NL-CAF-M ( $p=0.0228$ ), parámetro relacionado con la evitación de espacios abiertos que también muestra un comportamiento ansioso (Figura 33 C). En concordancia, el patrón inverso se observó al evaluar el porcentaje de EBA (Figura 33 D).

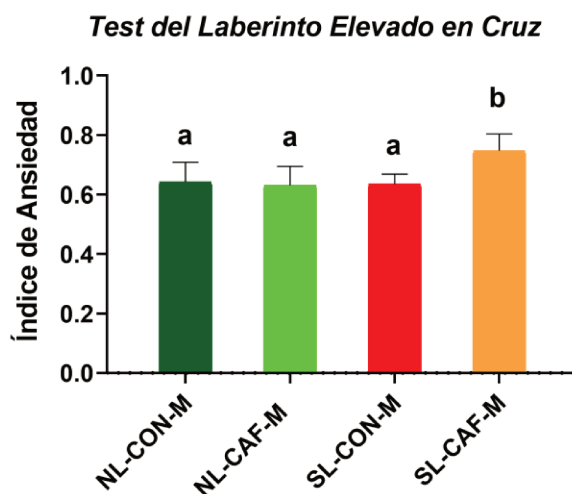
### Parámetros evaluados en el test del Laberinto Elevado en Cruz



**Figura 33** (A) Tiempo (minutos) en brazos cerrados (TBC), (B) en brazos abiertos (TBA), (C) porcentaje de entradas en los brazos cerrados (EBC) y (D) en los brazos abiertos (EBA). Ratas macho criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ .

Por otra parte, se calculó el IAn Índice de ansiedad (InA) para proporcionar información más sólida y clara. Valores cercanos a 1 indican mayor nivel de ansiedad. En este caso, este índice se vió afectado por el tipo de dieta administrada ( $p$  dieta=0.0410) y sugiere una posible

interacción de los factores evaluados ( $p$  interac.=0.05). Los animales del grupo SL-CAF-M presentaron los valores más elevados de InA ( $p = 0.0193$ ), indicando que la combinación de sobrealimentación neonatal y exposición a la dieta CAF en la edad adulta se asocia con un mayor estado de ansiedad (Figura 34).



**Figura 34.** Índice de ansiedad ( $InA$ ) =  $1 - ((TBA / \text{duración de la prueba}) + [EBA/EBA + EBC]/2)$ . Tiempo en los brazos abiertos (TBA), número de entradas en los brazos abiertos (EBA) y en brazos cerrados (EBC) en DPN 130, para ratas macho criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . DPN: día posnatal.

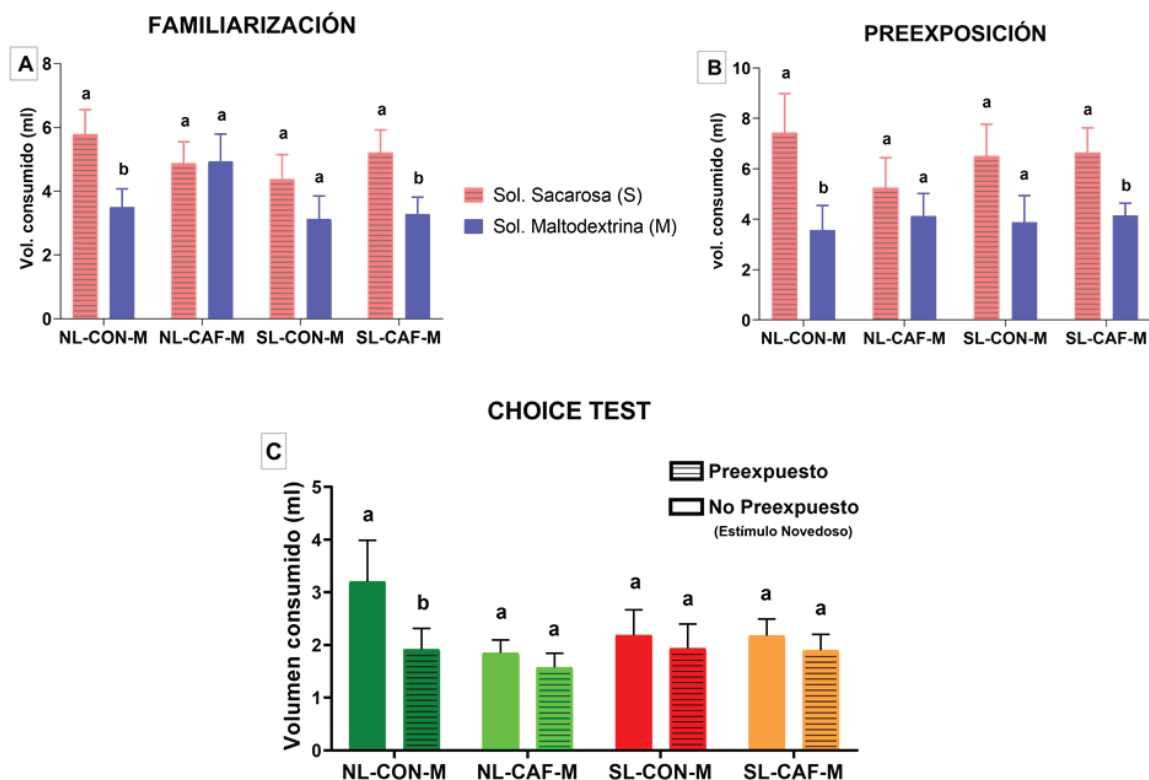
#### 4.1.7.2 Test de saciedad sensorial específica

El objetivo de esta prueba fue evaluar el estado de este fenómeno relacionado al placer y la ingesta de alimentos. Para ello, se midió el volumen de soluciones de sacarosa (S) y maltodextrina (M) proporcionadas durante la prueba. La saciedad sensorial específica se conserva cuando un individuo consume más de la solución novedosa (no expuesta previamente) que de la familiar (expuesta previamente).

En la fase de familiarización, los animales NL-CON-M ( $p = 0.0143$ ) y SL-CAF-M ( $p = 0.0080$ ) consumieron un mayor volumen de S que de M, mientras que los NL-CAF-M y SL-CON-M consumieron un volumen similar (Figura 35 A). Tras el periodo de preexposición, se observó un mayor volumen de S que de M en los grupos NL-CON-M ( $p = 0.0086$ ) y SL-CAF-M ( $p = 0.0121$ ), mientras que no hubo diferencias significativas en los grupos NL-CAF-M y SL-CON-M (Figura 35 B). Por su parte, en la fase de elección del test (*choice test*), los animales NL-CON-M consumieron mayores volúmenes de la solución nueva (no preexpuesta) que, de la solución pre expuesta, lo que indica una saciedad sensorial específica conservada ( $p = 0.393$ ) (Figura 35 C). Mientras que, los demás grupos experimentales (NL-CAF-M, SL-CON-

M y SL-CAF-M) consumieron volúmenes similares de la solución conocida y la novedosa (previamente expuesta frente a la novedosa  $p > 0.05$ ), lo que indica una alteración de la saciedad sensorial específica (Figura 35 C).

### Test de Saciedad Sensorial Específica



**Figura 35.** Volumen consumido de soluciones en: (A) Etapa de Familiarización; (B) Etapa de Pre Exposición y (C) *Choice Test*, en el DPN 140, en ratas macho (M) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANCOVA con *post hoc* Mann-Whitney U. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . DPN: día posnatal.

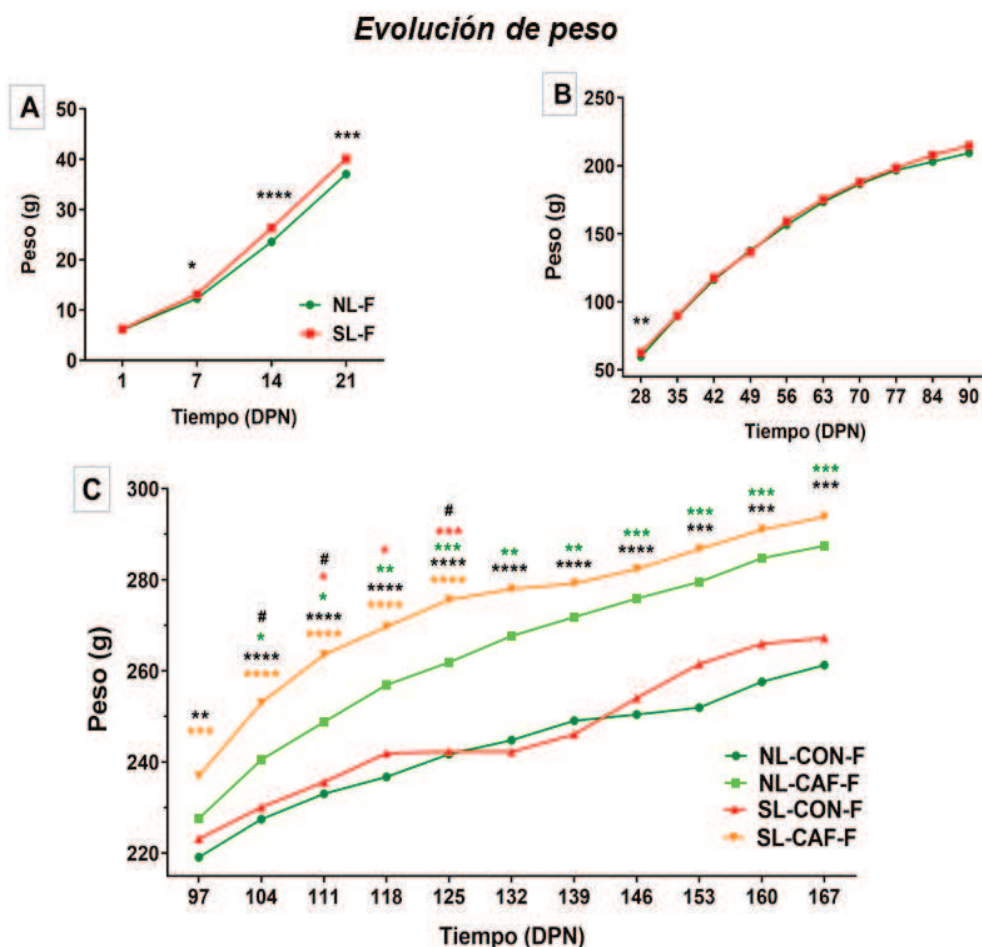
## 4.2 EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN NEONATAL Y DE LA DIETA CAF SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y METABÓLICOS EN HEMBRAS

### 4.2.1 Variables morfométricas en hembras

#### 4.2.1.1 Curvas de pesos durante todo el periodo experimental

Respecto a la ganancia de peso a lo largo del tiempo en las hembras, observamos que el grupo con sobrealimentación neonatal presentó mayor peso tras una semana de vida ( $p = 0.0158$ ) (Figura 36 A). Al DPN 21, la ganancia de peso fue sustancialmente notable en el grupo SL-F ( $p = 0.0005$ ) (Figura 36 A), confirmando el modelo de sobrealimentación neonatal. Luego del destete, ambos grupos recibieron alimentación con *pellet* y durante este periodo las hembras SL-F igualaron el peso a las NL-F (Figura 36 B). Tras el inicio con la dieta CAF,

aquellas que fueron alimentadas con pellet (NL-CON-F y SL-CON-F) presentaron un peso corporal inferior a las que recibieron dieta CAF (NL-CAF-F y SL-CAF-F) evidenciando el fuerte impacto que tiene la dieta sobre el peso corporal ( $p$  dieta  $<0.0001$ ). En contraste, el efecto de la sobrealimentación neonatal fue evidente al inicio de la exposición a la dieta CAF, pero se atenúa progresivamente hasta desaparecer en DPN125 (Figura 36 C).

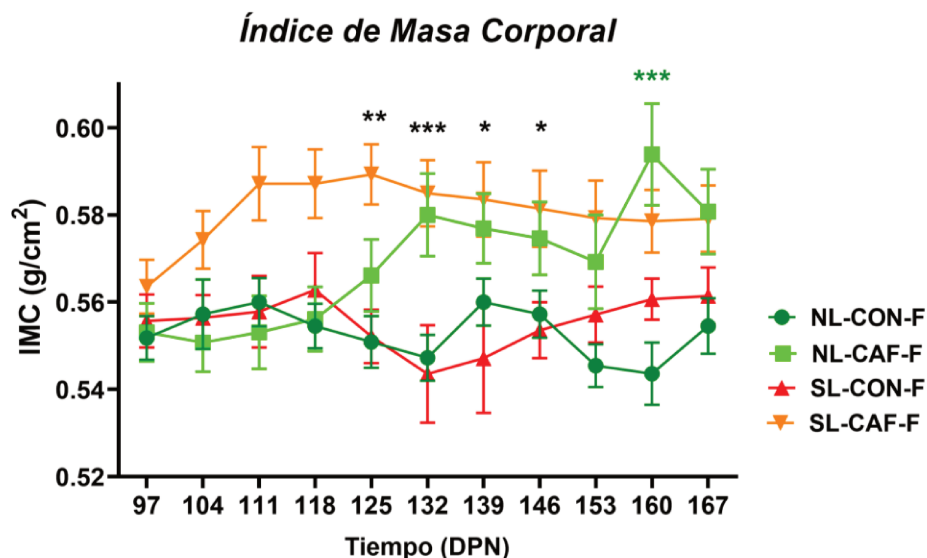


**Figura 36.** Evolución del peso corporal de ratas hembras (F) criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). (A) DPN 1 a 21 y (B) DPN 28 a 90 ( $n = 24 \pm 2$  por grupo). Los valores son medias  $\pm$  SEM según la prueba T de Student o Mann Whitney, \* con  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . (C) DPN 97 a 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Los valores representan medias  $\pm$  SEM. ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$ , \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Asteriscos negros indican diferencias entre SL-CON-F y SL-CAF-F, asteriscos verdes muestran diferencias entre NL-CON-F y NL-CAF-F; los rojos entre SL-CON-F y NL-CAF-F; en naranja las diferencias entre NL-CON-F y SL-CAF-F; # indica diferencias entre SL-CAF-F y NL-CAF-F. DPN: día posnatal.

#### 4.2.1.2 Evolución del IMC

En las hembras la curva de IMC reveló efectos diferenciales de la dieta y de la sobrealimentación neonatal a lo largo del período experimental. En el grupo SL-CAF-F se observó un mayor IMC tras 5 semanas de administración de alimentos palatables respecto

al grupo SL-CON-F ( $p=0.001$ ). Mientras que, entre NL-CAF-F vs. NL-CON-F, este incremento en el IMC fue estadísticamente significativo únicamente en DPN160 ( $p=0.0006$ ) (Figura 37).



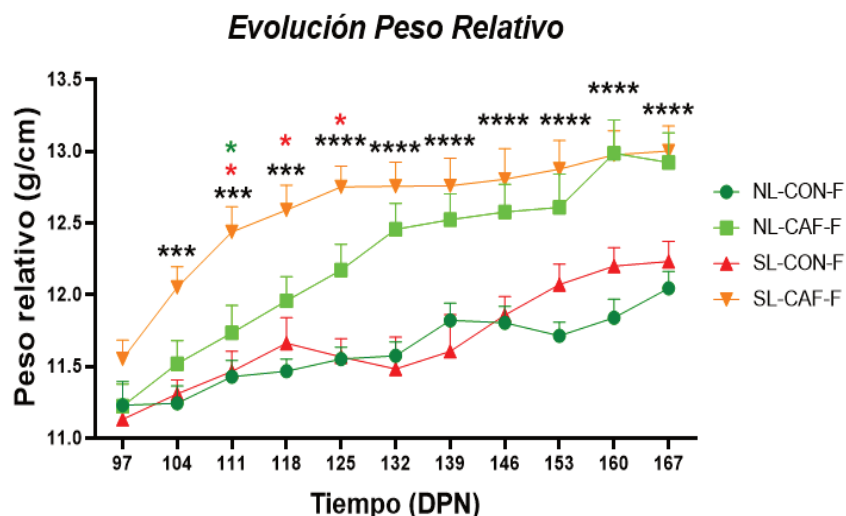
**Figura 37.** Evolución del índice de masa corporal (IMC) en ratas hembras (F) criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta cafetería (CAF) entre los días DPN 97 y 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías con *post hoc* de Tukey, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$ , \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Asteriscos verdes muestran diferencias entre NL-CON-F y NL-CAF-F; negros entre SL-CON-F y SL CAF-F. DPN: día posnatal.

#### 4.2.1.3 Evolución del Peso relativo

También se analizó la evolución del peso corporal relativo, para complementar la valoración del estado nutricional. En la Figura 38, se puede visualizar el aumento progresivo de este parámetro en todos los grupos, a lo largo del periodo experimental. Principalmente, presentando diferencias significativas en función de la dieta y, en menor medida, por la sobrealimentación neonatal.

Mientras que, tras 1 semana de dieta CAF (DPN97) no se observaron diferencias entre los grupos experimentales, dos semanas fueron suficientes para hacer notar el impacto de la misma sobre el peso. Así, en DPN 104 el peso relativo fue sustancialmente mayor en los grupos CAF ( $p$  dieta  $< 0.001$ ) en comparación con sus respectivos controles (NL-CON y SL-CON). Este comportamiento de la variable peso relativo, se perpetuó a lo largo de todo el periodo experimental hasta DPN 167.

En relación con la condición neonatal, las diferencias fueron menos consistentes y se hicieron evidentes desde DPN 111 a 125 ( $p=0.03$  a  $0.01$ ), tras lo cual se diluyeron hasta el final de la experiencia.



**Figura 38.** Evolución del Peso Relativo en ratas hembras (F) criadas en camadas normales (NL) o pequeñas (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta cafetería (CAF) entre los días DPN 97 y 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$ , \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Asteriscos verdes muestran interacción entre los factores evaluados; negros diferencias por el factor dieta, rojo diferencias por el factor sobrealimentación nenoatal. DPN: día posnatal.

#### 4.2.2 Parches de tejido adiposo en DPN167 en hembras

La tabla 9 muestra el peso de los parches adiposos gonadal (TAG) y perirrenal (TAP) analizado en las hembras en DPN 167. El peso del TAG se vio afectado por la dieta administrada ( $p$  dieta  $< 0.0001$ ), siendo más elevado en los grupos CAF como era esperado, al igual que en el TAP ( $p$  dieta  $< 0.0001$ ).

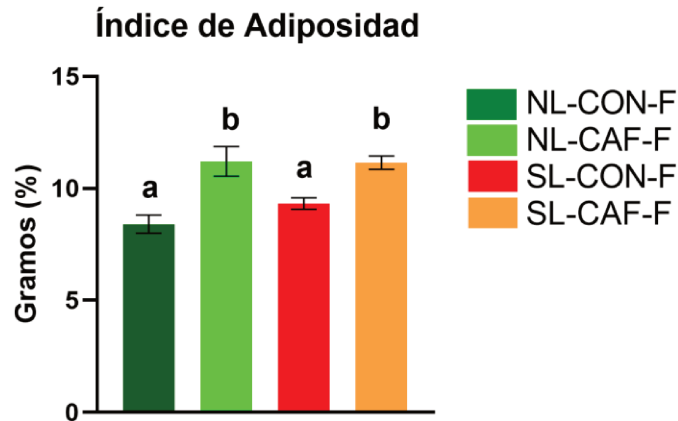
**Tabla 9.** Parches del tejido adiposo en hembras

Parámetro (DPN 167)	NL-CON-F	NL-CAF-F	SL-CON-F	SL-CAF-F	Análisis estadístico (ANOVA de 2 vías)
TAG (g)	$13.26 \pm 0.8264^a$	$18.85 \pm 0.9629^b$	$14.99 \pm 0.5546^a$	$19.03 \pm 0.7530^b$	$p$ dieta $< 0.0001$
TAP (g)	$8.227 \pm 0.5140^a$	$11.55 \pm 0.4538^b$	$9.350 \pm 0.4199^a$	$12.79 \pm 0.5458^b$	$p$ dieta $< 0.0001$

Peso (g) del tejido adiposo gonadal (TAG) o perirrenal (TAP) de ratas hembras (F) criadas en camadas normales (NL) o reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN 167. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). DPN: día posnatal.

#### 4.2.3 Índice de adiposidad en DPN 167 en hembras

Como se muestra en la Figura 39 el IAd en las hembras presentó un aumento a causa de la dieta CAF ( $p$  dieta  $< 0.0001$ ) independientemente de la sobrealimentación neonatal. Estas diferencias se hicieron evidentes para ambos grupos CAF (NL-CAF-F:  $p < 0.0001$ ; SL-CAF-F:  $p = 0.0031$ ) respecto a sus controles.



**Figura 39** Índice de adiposidad (%) en ratas hembras (F) criadas en camada normal (NL) o camada reducida (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) desde el DPN 90 al 167. Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). DPN: día posnatal.

#### 4.2.4 Parámetros bioquímicos en DPN 167 en hembras

También se analizó la concentración sérica de metabolitos y hormonas circulantes. Las hembras con sobrealimentación neonatal presentaron valores más elevados de glucemia ( $p$  sobrealim.  $< 0.0001$ ; NL-CON-F vs. SL-CON-F,  $p = 0.02$ ; NL-CAF-F vs SL-CAF-F,  $p < 0.0001$ ), independiente de la dieta administrada. Sorprendentemente, los niveles de colesterol sérico fueron menor en los animales CAF ( $p$  dieta =  $0.0005$ ; NL-CON-F vs NL-CAF-F,  $p = 0.0078$ ; SL-CON-F vs SL-CAF-F,  $p = 0.0149$ ). Mientras que, para los triglicéridos, la sobrealimentación neonatal produjo un efecto sobre la concentración plasmática ( $p$  sobrealim. =  $0.0430$ ), siendo significativa esta diferencia entre los animales NL-CAF-F vs SL-CAF-F ( $p = 0.0323$ ) (Tabla 10), con un incremento importante en este último grupo.

Tal como se pensaba, las concentraciones séricas de insulina aumentaron a causa de la dieta CAF ( $p$  dieta =  $0,0055$ ), reflejado en el grupo NL ( $p = 0,0034$ ). Los animales con sobrealimentación neonatal mostraron una tendencia al aumento, cercana a la significancia estadística ( $p = 0,0716$ ) (Tabla 10).

En concordancia a lo esperado para, el HOMA-IR, la dieta CAF produjo mayor resistencia a la insulina ( $p$  dieta =  $0,0097$ ), en particular dentro de los animales NL ( $p = 0,030$ ). Además, se observó una tendencia a la interacción ( $p$  interac. =  $0,0794$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Parámetros bioquímicos en hembras

Parámetro (DPN 167)	NL-CON-F	NL-CAF-F	SL-CON-F	SL-CAF-F	Análisis estadístico (ANOVA de 2 vías)
Glucosa (mg/dL)	93.10 ± 2.408 <sup>a</sup>	85.90 ± 2.619 <sup>a</sup>	103.6 ± 4.750 <sup>b</sup>	105.5 ± 1.638 <sup>b</sup>	p sobrealim. <0.0001
Colesterol (mg/dL)	88.73 ± 8.105 <sup>a</sup>	63.33 ± 5.358 <sup>b</sup>	81.80 ± 5.847 <sup>a</sup>	58.73 ± 6.091 <sup>b</sup>	p dieta = 0.0005
Triglicéridos (mg/dL)	119.2 ± 2.121 <sup>ab</sup>	115.9 ± 6.351 <sup>a</sup>	123.8 ± 2.835 <sup>ab</sup>	129.9 ± 5.301 <sup>b</sup>	p sobrealim. = 0.0430
Insulinemia (μU/ml)	23.86 ± 0.123 <sup>a</sup>	24.72 ± 0.469 <sup>b</sup>	23.91 ± 0.129 <sup>ab</sup>	24.50 ± 0.452 <sup>ab</sup>	p dieta = 0.0055
HOMA-IR	5.840 ± 0.28 <sup>a</sup>	7.110 ± 0.442 <sup>b</sup>	5.996 ± 0.31 <sup>ab</sup>	6.374 ± 0.399 <sup>ab</sup>	p dieta = 0.0097

Nivel de metabolitos plasmáticos (mg/dL) de ratas hembras (F) criadas en camadas normales (NL) o camadas reducidas (SL) alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF) en DPN 167. Los valores representan medias ± SEM (n = 12±2 por grupo). ANOVA de 2 vías y *post hoc* LSD de Fisher. Letras diferentes indican diferencia significativa (p < 0.05), ns indica ausencia de diferencia estadística. DPN: día posnatal.

#### 4.2.5 Efectos de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF sobre la ingesta de alimentos en hembras

##### 4.2.5.1 Curva de ingesta de alimentos dulces, salados y pellet durante el desafío con dieta CAF

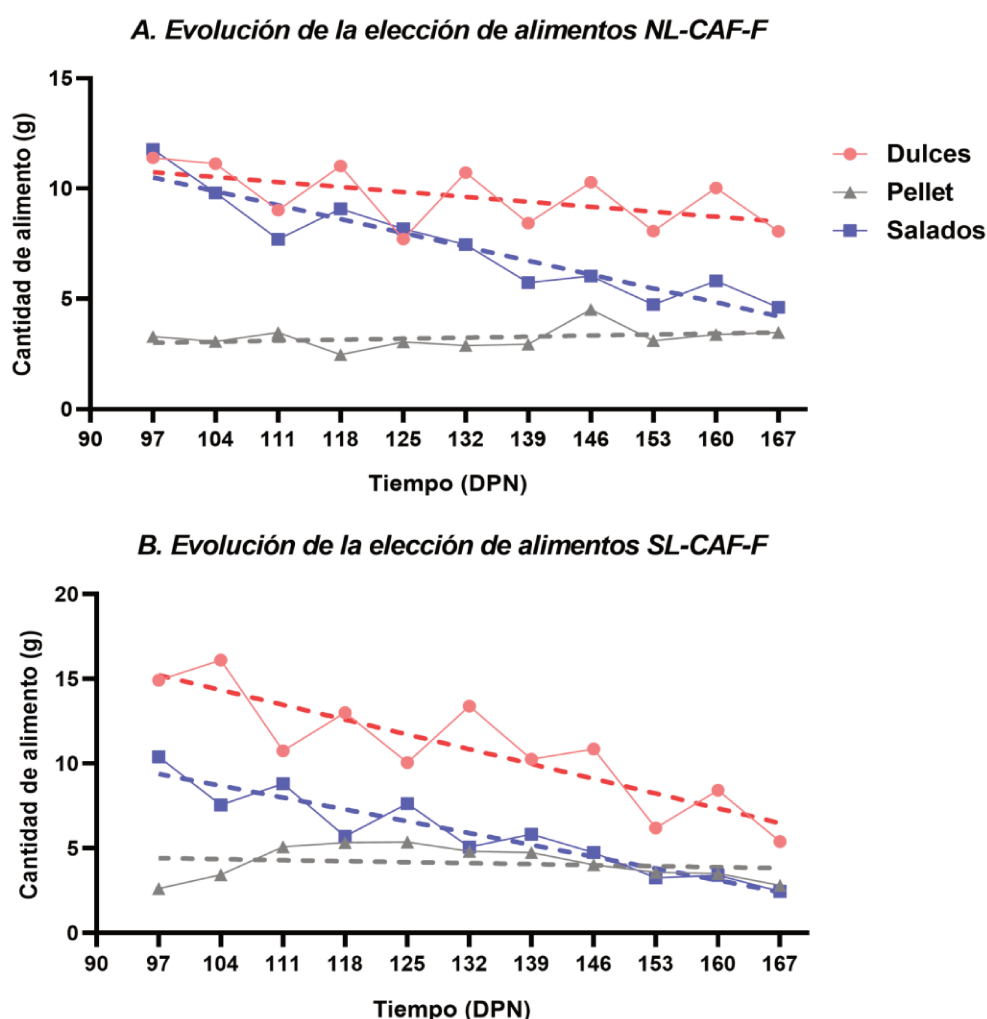
Al igual que en los machos, para evaluar la ingesta de la dieta CAF de las hembras se realizó un análisis del consumo de alimentos agrupándolos por sabor (dulce o salado) y pellet (Figura 40).

La ingesta de alimentos dulces de las hembras NL-CAF-F disminuyó a lo largo del tiempo (línea punteada rosa, Pendiente: -0.0321; p = 0.0014) al igual que el de los salados (línea punteada azul, Pendiente: -0.1289; p < 0.0001), mientras que el consumo de pellet fue relativamente estable (línea punteada gris, Pendiente: 0.0066; p = 0.0906). Al comparar las pendientes, fue posible detectar un consumo diferencial entre los alimentos dulces y salados (p < 0.0001), entre los salados y pellet (p < 0.0001) y particularmente entre dulces y pellet (p = 0.0002), ya que los alimentos dulces decrecieron en relación al pellet (Figura 40 A).

Por el contrario de lo esperado, el grupo SL-CAF-F disminuyó la elección de alimentos dulces (línea punteada rosa; Pendiente: -0.1733; p < 0.0001), salados (línea punteada azul, pendiente: -0.1210; p < 0.0001) y pellet (línea punteada gris, pendiente: -0.01455; p = 0.0058). Sugiriendo una conducta hipofágica a lo largo del periodo experimental, respecto a las hembras NL-CAF-F (Figura 40 B). En la comparación de pendientes de los grupos de alimentos, los SL-CAF-F presentaron diferencias en la ingesta de los alimentos dulces y

salados ( $p = 0.0014$ ), dulces y pellet ( $p < 0.0001$ ), salados y pellet ( $p < 0.0001$ ), al igual que en las NL-CAF-F (Figura 40 B).

Por su parte, el análisis del consumo comparativo entre los grupos experimentales NL-CAF-F vs SL-CAF-F demostró diferencias en el consumo de alimentos dulces ( $p < 0.0001$ ) con una pendiente más pronunciada en el grupo SL (disminución mayor de los alimentos dulces). De la misma manera sucedió con el pellet ( $p = 0.0078$ ), pero sin esta diferencia tan pronunciada entre los grupos y en el sentido contrario (aumentando levemente el consumo), en tanto que no hubo cambios en el consumo de los alimentos salados ( $p = 0.5610$ ) entre los grupos CAF.



**Figura 40.** Evolución de la elección de alimentarias CAF (g/animal) a lo largo del tiempo, en hembras (F) criadas en A. camada normal (NL) B. camada reducida (SL), alimentadas con dieta control (CON) o dieta de cafetería (CAF). DPN 97 a 167 ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Los valores representan medias  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Regresión lineal y comparación de pendientes con prueba F. Las líneas punteadas muestran las tendencias de ingesta a lo largo del tiempo. DPN: día posnatal.

### 4.3 VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DEL TEST EPM MEDIANTE RATRACK

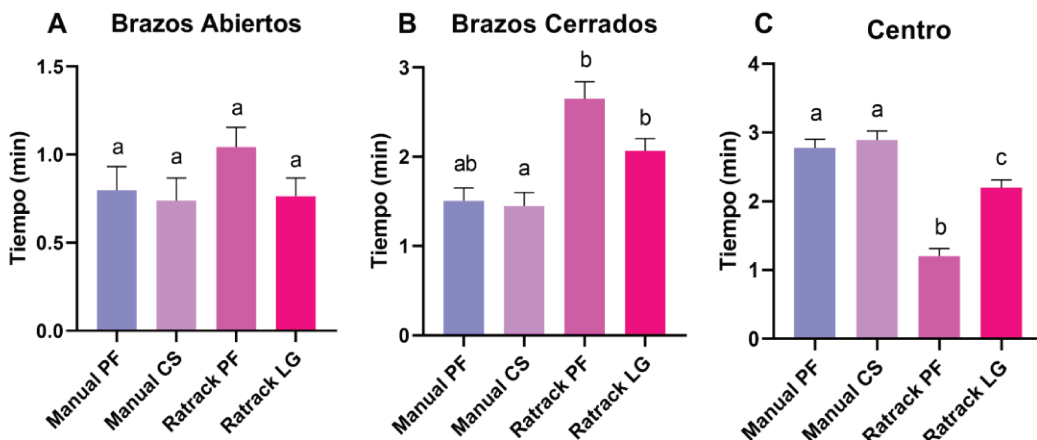
Con el objetivo de evaluar la fiabilidad del software RaTrack, los registros de video correspondientes al test del EPM fueron analizados de manera independiente mediante evaluación manual y análisis automatizado a doble ciego. Con el objetivo de optimizar el proceso de validación, se seleccionaron tres de los parámetros más relevantes del test: el tiempo en el centro, en los brazos abiertos y en los brazos cerrados.

El análisis comparativo no mostró diferencias significativas en los tiempos registrados en los brazos abiertos ( $p=0,2750$ ) entre los distintos evaluadores, tanto en el análisis manual como en el realizado mediante RaTrack (Figura 41 A).

En contraste, se detectaron discrepancias en la cuantificación del tiempo en los brazos cerrados ( $p < 0,0001$ ) entre los diferentes métodos de análisis. Los animales analizados con RaTrack presentaron un mayor tiempo en los brazos cerrados en comparación con los grupos evaluados manualmente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados manualmente entre sí al igual que los analizados con RaTrack (Figura 41 B).

Respecto al tiempo de permanencia en la zona central, se detectaron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,0001$ ). Los animales analizados manualmente (PF y CS) presentaron un mayor tiempo en la zona central en comparación con los analizados con RaTrack. No se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados manualmente, pero sí se observaron diferencias en el análisis de esta zona con RaTrack (Figura 41 C).

#### ***Tiempo de permanencia en los parámetros analizados.***



**Figura 41.** Gráfica que muestra el tiempo de permanencia en los (A) brazos abiertos, (B) brazos cerrados y (C) zona central del test del laberinto en cruz elevado (EPM) en ratas macho, evaluado a doble ciego por distintos evaluadores mediante el uso de RaTrack o análisis manual. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 12 \pm 2$  por grupo). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido del test *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). DPN: día posnatal. Diferentes siglas indican nombres de operarios.

## **5 DISCUSIÓN**

El presente trabajo, tuvo como objetivo analizar los efectos individuales de la sobrealimentación en las primeras etapas de la vida (centrándonos en su impacto a largo plazo) y la exposición a CAF en la edad adulta, así como su efecto combinado, sobre la regulación central de la ingesta de alimentos y el equilibrio metabólico. El mismo se basó en la hipótesis de que la sobrealimentación neonatal, deja una huella persistente en los mecanismos centrales de regulación de la ingesta. Esta huella se manifestaría como una respuesta conductual y molecular alterada ante la exposición a un estímulo alimentario hedónico en la adultez.

En concreto, propusimos que la sobrenutrición en las primeras etapas de la vida predispone a los animales a una regulación deficiente del comportamiento alimentario cuando se exponen a CAF en la edad adulta. Es importante señalar que el uso de un diseño factorial con cuatro grupos experimentales (NL-CON, NL-CAF, SL-CON, SL-CAF) para ambos sexos, ofreció un diseño robusto que permitió identificar claramente tanto los efectos individuales como los combinados de la sobrenutrición temprana y la dieta ofrecida en la edad adulta.

### **5.1 EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN NEONATAL Y LA DIETA CAF SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y METABÓLICOS**

Caracterizamos la evolución del peso corporal en SL y NL desde el destete hasta DPN 167. Los animales SL-M mostraron un aumento de peso acelerado durante la lactancia y un peso corporal significativamente mayor en el destete (DPN21), lo que confirmó la aptitud del modelo como generador de obesidad neonatal. La diferencia entre NL-M y SL-M disminuyó gradualmente después del destete al recibir ambos grupos alimento control, y el peso corporal entre los grupos se igualó en DPN90. No obstante, el peso del parche adiposo perirrenal siguió siendo mayor en SL-M que en NL-M en machos. Esta observación concuerda con informes previos de nuestro grupo (Rossetti et al., 2024, 2025; Schumacher et al., 2021, 2023), lo que refuerza la idea de que la sobrealimentación en las primeras etapas de la vida puede provocar aumentos temporales del peso corporal que pueden normalizarse en condiciones dietéticas equilibradas a los 90 días de edad, en consonancia con los hallazgos previos de nuestro grupo y otros (Bassett & Craig, 1988; De Andrade Silva et al., 2021; Hou et al., 2011; Plagemann et al., 2009, 2010; Schumacher et al., 2021, 2023; Spencer & Tilbrook, 2009; Velkoska et al., 2008). A pesar de la normalización del peso corporal, los animales SL-M conservaron un aumento de la masa de depósitos de grasa tanto en DPN90 como en DPN167, lo que indica que la adiposidad a largo plazo es un posible sello distintivo de la sobrealimentación temprana. Estos resultados coinciden con los de Argente-

Arizon et al. (2016), quienes observaron diferencias persistentes en el peso de los depósitos de grasa a pesar de que no se produjeron cambios en el peso corporal total. En el caso de las hembras se pudo constatar el mismo patrón en el peso corporal hasta el destete y luego hasta DPN90. Es relevante destacar que las hembras presentaron una normalización de su peso corporal más temprana (DPN 35) en comparación con los machos (DPN 70). Esta observación coincide con la ventana de divergencia madurativa y el inicio de las fluctuaciones hormonales de la pubertad (entre DPN 30 y 42 en la cepa Wistar). En particular, el incremento de los niveles de estradiol en esta etapa podría ejercer un efecto compensatorio, dado su rol en la modulación del metabolismo energético y la ingesta (Bell, 2018; Vigil et al., 2022; Maric et al, 2025). Estos resultados nos inducen a profundizar los estudios en las hembras y evaluar la influencia del dimorfismo sexual en los parámetros estudiados.

Al final del periodo experimental, observamos un marcado aumento del IMC en los machos de todos los grupos tratados en comparación con el grupo NL-CON-M, lo que concuerda con hallazgos previos (Aiassa et al., 2022; Bonfim et al., 2021; Gomez-Smith et al., 2016; Stefanidis & Spencer, 2012; Vargas et al., 2025). En el caso de las hembras, el comportamiento del IMC sufrió un patrón diferencial entre los grupos experimentales y se observó aumento del IMC en los animales SL tras 5 semanas de dieta CAF, en tanto que los NL presentaron un aumento del IMC tras 11 semanas de CAF. Nuevamente, esto demuestra que el comportamiento es diferente en cada sexo.

A nivel experimental, en líneas generales no se han establecido rangos de normalidad del IMC, como sí sucede en humanos. Los estudios evalúan el grado de la obesidad en base al peso corporal ganado en comparación con un grupo control. Novelli et al. (2007) ha propuesto como valores normales de IMC entre 0,45 y 0,68 g/cm<sup>2</sup> para ratas adultas macho, siendo este valor máximo umbral para la determinar obesidad. Por el contrario, para la valoración antropométrica de las hembras no fue posible determinar un valor de corte dada la variabilidad de valores reportados (Bilibio et al., 2023; Greash et al., 2024).

Como se mencionó anteriormente, este comportamiento diferencial en las hembras evidencia, una vez más, la existencia de mecanismos compensatorios que interfieren en los efectos de la programación metabólica a largo plazo, relacionados al impacto de los estrógenos sobre el metabolismo energético y los sistemas de regulación de la ingesta (Vigil et al., 2022). En esta etapa, las ratas hembras (consideradas adultas maduras) presentan ciclos estrales regulares y una secreción cíclica de estradiol, hormona que ha sido ampliamente implicada en la modulación de circuitos hipotalámicos asociados al balance energético (Quirós Cognuck et al., 2020; Bell, 2018). En este contexto, la influencia

estrogénica podría estar contrarrestando el efecto de la sobrealimentación a largo plazo en las hembras, ventaja biológica que no se observa en los machos, aunque no sería suficiente para contrarrestar los efectos de la dieta CAF.

Además, cabe mencionar que la mayor variabilidad observada en la curva de IMC respecto al peso corporal responde a que el IMC es un parámetro que toma en cuenta el peso y longitud naso-anal. En particular, pequeñas variaciones en la medición de la longitud naso-anal, sumadas al crecimiento no lineal propio del desarrollo, generan oscilaciones más marcadas que las observadas en la curva de peso. Tal como lo demuestran numerosos estudios, es un parámetro que, en conjunto con otros indicadores morfométricos permite ampliar la valoración e interpretación de resultados (Novelli et al., 2007; Greash et al., 2024; Vargas et al., 2025). Por otra parte, como indican los resultados del IAd, el IMC aumentó debido al incremento de la masa grasa corporal en los machos. Es importante destacar que, en el grupo que recibió sobrealimentación neonatal como estímulo (SL-CON-M) el aumento de la adiposidad se debió únicamente a un aumento del TAP, en tanto que, en los grupos expuestos a CAF (NL-CAF-M y SL-CAF-M), el aumento del IMC se debió al incremento del TAP y del TAE. Este punto resulta interesante ya que el TAE está relacionado con la grasa visceral, considerada con mayor actividad metabólica y potencialmente más dañina (Kim & Park, 2008).

En hembras, la dieta CAF aumentó el índice de adiposidad, mientras que la sobrealimentación neonatal no produjo cambios significativos. Esto podría relacionarse con diferencias sexuales en la distribución grasa y con el efecto protector de los estrógenos, ya que en condiciones normales las hembras presentan menor tendencia al acúmulo visceral y una mayor proporción relativa de tejido adiposo subcutáneo (Quirós Cognuck et al., 2020; Argente-Arizona et al., 2016).

Estas diferencias respaldan la idea de que no todo el aumento de peso o la acumulación de grasa son metabólicamente equivalentes, y que la distribución y la función de la grasa desempeñan un papel clave en los resultados relacionados con la obesidad. A su vez, pone de relieve la importancia de evaluar el estado nutricional junto con la adiposidad para evaluar la salud metabólica, especialmente en modelos de programación nutricional temprana. Nuestras consideraciones concuerdan con las conclusiones de Conceição et al. (2011), quienes afirman que los programas de nutrición temprana influyen en el funcionamiento de la grasa, y no solo en la cantidad que se acumula, al moldear la función de los adipocitos, la producción de leptina y el riesgo metabólico asociado a la obesidad.

En cuanto a los parámetros bioquímicos, solo el grupo SL-CAF-M mostró valores de hiperglucemia. Estudios previos de nuestro grupo y de otros han informado de niveles de glucosa inalterados tras la administración de dieta CAF (Buyukdere et al., 2019; Lazzarino et al., 2017, 2019). Sin embargo, otros autores han descrito alteraciones en el metabolismo de la glucosa y el fenotipo del síndrome metabólico en modelos de sobrealimentación neonatal (Plagemann et al., 2010) o en respuesta a la administración de una dieta CAF (Bonfim et al., 2021; Gomez-Smith et al., 2016). En este parámetro, ambos estímulos fueron necesarios para provocar la alteración. Para el caso de las hembras la glucemia presentó aumento a causa de la sobrealimentación neonatal y de la dieta CAF, a diferencia de los machos donde el efecto de los factores analizados no fue tan evidente. Otra diferencia respecto de los machos fue que el grupo con sobrealimentación neonatal y dieta CAF (SL-CAF-F) incrementó los TG respecto a NL-CAF-F. Quirós Cognuck et al. (2020) y Argente-Arizón et al. (2016) reportaron que los procesos de envejecimiento en el metabolismo energético de las ratas son específicos de cada sexo, con un mejor perfil lipídico y tolerancia a la glucosa en las hembras adultas y otros parámetros metabólicos como la insulinemia. Por el contrario de lo esperado, en nuestro estudio, en los machos los TG permanecieron estables, posiblemente por una mayor capacidad de secuestro lipídico en depósitos grasos como adaptación metabólica. Mientras que en las hembras la sobrealimentación neonatal incrementó estos niveles, evidenciando una respuesta diferencial y sexo-específica del metabolismo lipídico frente a un desafío nutricional temprano. En este sentido, futuros estudios en hembras deberían profundizar en los mecanismos responsables de esta respuesta en los triglicéridos inducidos por la sobrealimentación neonatal.

## **5.2 PROGRAMACIÓN TEMPRANA DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO Y LA RESPUESTA A LA DIETA EN LA ADULTEZ**

Numerosos estudios indican que tanto el exceso ingesta en las primeras etapas de la vida como la exposición de los adultos a una dieta CAF alteran los mecanismos relacionados con la homeostasis metabólica (Bei et al., 2015; Lanza & Snoeren, 2021; Marousez et al., 2019; Teixeira et al., 2019). Nuestro trabajo mostró concentraciones elevadas de insulina sérica debido a la obesidad neonatal en la adultez y también la exposición a CAF en la etapa adulta provocó hiperinsulinemia. Los niveles de glucosa en ayunas aumentaron en las ratas NL-CAF-F. Esto podría sugerir que, en este grupo, el aumento de insulina ya no es suficiente para ejercer sus efectos fisiológicos. De manera consistente, se observó resistencia a la insulina en todos los grupos en comparación con NL-CON-F. Los estudios que evalúan los efectos de la dieta CAF a diferentes edades han reportado resultados variables: mientras que

algunas investigaciones en ratas adultas jóvenes han mostrado evidencia clara de resistencia a la insulina (Teixeira et al., 2019), otras no han detectado tales efectos (Lazarino et al., 2019). Por el contrario, las pruebas de las consecuencias a largo plazo de la sobrealimentación neonatal son más sólidas, y varios informes muestran un aumento del HOMA-IR en la edad adulta (Bei et al., 2015). En conjunto, estos resultados ponen de relieve que la sobrealimentación en las primeras etapas de la vida induce alteraciones duraderas en la señalización de la insulina y la vulnerabilidad metabólica.

La alimentación con CAF en la edad adulta en machos indujo sobrepeso en todos los grupos. Curiosamente, este aumento de peso se produjo más tarde en los animales SL-CAF-M, lo que sugiere una respuesta retardada a la dieta apetecible. Contrariamente a nuestra hipótesis inicial, la combinación de sobrealimentación neonatal y exposición a CAF en la edad adulta no exacerbó el aumento de peso ni la ingesta de energía. El grupo SL-CAF-M mostró un patrón de alimentación diferente caracterizado por la presencia de hipofagia, característica que fue más pronunciada a medida que avanzaba el experimento. Esta reducción de la ingesta de CAF en los animales SL sugiere que la sobrealimentación temprana altera el procesamiento hedónico a largo plazo. La respuesta hipofágica en los animales SL-CAF-M puede reflejar una disminución de la motivación hacia los alimentos apetecibles o una aparición más temprana de la saciedad. Si bien otros estudios han observado hipofagia en roedores alimentados con CAF a largo plazo, nuestros datos sugieren que este comportamiento aparece antes en animales con sobrealimentación neonatal (Gomez-Smith et al., 2016; Lanza & Snoeren, 2021; Lazarino et al., 2019; Mattar et al., 2023). Una posible explicación es la pérdida del efecto de novedad hacia los alimentos apetecibles o una desensibilización acelerada de las vías de recompensa. Esta observación plantea la cuestión de si la sobrealimentación neonatal modula la autorregulación de la ingesta o conduce a una respuesta de recompensa deteriorada, lo que podría contribuir a un estado similar a la anhedonia. Por su parte, las hembras SL no solo disminuyeron más el consumo de los alimentos dulces, sino que también redujeron el de los alimentos salados y pellet, lo que podría estar relacionado no solo con una conducta hipofágica sino de tipo anhedónica como se refleja en los machos.

Nuestros resultados también muestran que, independientemente de la situación en las primeras etapas de la vida, la dieta CAF aumenta la eficiencia metabólica y calórica, lo que concuerda con otros informes que demuestran que este tipo de dieta promueve una ingesta excesiva de calorías y una conversión eficiente de la energía en tejido adiposo (Buyukdere et al., 2019; White et al., 2009).

En relación con la elección de alimentos, las ratas SL-CAF-M mostraron patrones de alimentación alterados a lo largo del tiempo en comparación con las NL-CAF-M. Observamos que el grupo NL-CAF-M presentó una disminución progresiva en la ingesta de alimentos salados. Este perfil concuerda con la preferencia de este grupo por los alimentos dulces. Por el contrario, Bonfim et al. (2021) informaron de una menor preferencia por los alimentos ricos en carbohidratos, representados especialmente por los alimentos dulces.

Como sugiere Blum (2014), el azúcar puede actuar como una sustancia psicoactiva, asociada a procesos similares a los de la adicción, lo que explicaría su elección como alimento incluso cuando se dispone de una gama variada de alimentos. Además, es interesante señalar que el concepto de “adicción a la comida”, que fue una de las varias causas propuestas para la epidemia de obesidad, se explica en términos del azúcar como sustancia psicoactiva. Sin embargo, otros estudios han sugerido que la exposición crónica a dietas muy apetecibles, como la CAF, podría alterar la motivación por el sabor dulce (Fam et al., 2022). Algunos autores han señalado que la preferencia por los sabores dulces está relacionada con la actividad del sistema serotoninérgico (Blum et al., 2014), lo que proporciona una base neurobiológica para este cambio en la motivación alimentaria.

En el grupo SL-CAF-M observamos una disminución progresiva en el consumo de alimentos dulces, acompañada de un aumento sostenido en la ingesta de pellet, un alimento con menor valor hedónico. Este patrón podría interpretarse como un signo de alteración del sistema hedónico, posiblemente relacionado con el comportamiento anhedónico que hemos descrito anteriormente y es compatible con la hipótesis del síndrome de deficiencia de recompensa propuesta por Blum et al. (2014). Este fenómeno, de origen genético y epigenético, evidencia un deterioro de los circuitos de recompensa del cerebro, lo que da lugar a una hipofunción de la vía dopaminérgica, asociado también a una mayor ansiedad (Blum et al. 2014).

El dimorfismo sexual también se hizo notar en las preferencias de consumo de las hembras CAF. La disminución de la ingesta de los alimentos, en ambos grupos podría estar explicada por el estradiol que actúa como potente anorexigénico al estimular las neuronas POMC e inhibir NPY (Vigil et al., 2022). De manera particular, se evidenció una disminución más notoria en los animales con sobrealimentación neonatal lo cual sugería una conducta hipofágica, relacionada posiblemente con una disfunción en el sistema de recompensa como en el caso de los machos. Un estudio realizado por Klump et al. (2021) en ratas ovariectomizadas presentaron un consumo aumentado de alimentos palatables y menor de pellet (alimento con baja carga hedónica), sugiriendo que los estrógenos también tienen impacto en el sistema de recompensa. Por otra parte, Maric et al. (2025) evaluaron los niveles

de estrógenos en la amígdala cerebral y hallaron que una inhibición de la aromatasas (enzima principal implicada en la síntesis) se traduce en un aumento de la ingesta y de la termogénesis. Así mismo, informaron que esta disminución en los estrógenos a nivel central originó mayor preferencia por los alimentos ricos en grasas, pero no en sacarosa (Maric et al., 2025). Estos antecedentes permiten remarcar el papel de los estrógenos en la modulación del consumo de alimentos, actuando sobre circuitos centrales en los que convergen mecanismos homeostáticos y hedónicos, integrados en regiones como la amígdala.

En este contexto, es esencial comprender cómo las primeras experiencias nutricionales moldean no sólo el comportamiento alimentario, sino también la valoración hedónica de los alimentos. Esta información podría ser clave para el desarrollo de intervenciones que no se limiten a regular el equilibrio energético, sino que también tengan en cuenta los aspectos emocionales y motivacionales que guían la ingesta.

Aunque numerosos estudios han demostrado la preferencia por el sabor dulce a través de diversas pruebas y análisis (Conceição et al., 2016; Fam et al., 2022; Myers, 2017), no hay informes sobre la cantidad de comida chatarra consumida en relación con los alimentos dulces o salados. Esto es especialmente significativo en el contexto de la dieta CAF, donde ciertas características intrínsecas de los alimentos ultraprocesados pueden potenciar la elección de lo dulce o lo salado. Un estudio realizado por (Bonfim et al., 2021) evaluó el consumo de alimentos en roedores mediante la administración de tres tipos de dietas: la dieta CON en forma de pellets y la dieta occidental, y alimentos CAF reales. Un hallazgo notable fue la mayor ingesta de alimentos en el grupo CAF, lo que subraya la importancia de utilizar este tipo de dieta para los experimentos (Bonfim et al., 2021).

### **5.3 EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE LA SACIEDAD Y LA ANSIEDAD**

En este contexto, resulta central destacar el concepto de saciedad sensorial específica, entendido como el proceso mediante el cual el placer asociado al consumo de un determinado alimento disminuye de manera selectiva, mientras se mantiene la motivación por otros alimentos con características sensoriales diferentes (Rolls et al., 1981). Sin embargo, cuando se dispone de una variedad de alimentos apetecibles, como es el caso de la dieta CAF, una persona puede seguir comiendo más allá del punto de saciedad debido a la diversidad de sabores y texturas (Myers, 2017).

Llamativamente en el presente trabajo, las primeras etapas del test de SSS (familiarización y preexposición), mostró que los animales NL-CON-M y SL-CAF-M presentaron mayor preferencia por la S, pero solo el primero presentó SSS conservada en el momento del *choice*

*test*. La preferencia inicial por la sacarosa es fisiológicamente esperable debido a su mayor palatabilidad y poder hedónico, y refleja un sistema de recompensa flexible y adaptable, capaz de discriminar adecuadamente el valor sensorial de los estímulos alimentarios cuando se da la posibilidad de elección, tal como sucede en el grupo NL-CON-M. Por el contrario, en los animales SL-CAF-M, sugiere una respuesta intensificada a los estímulos dulces, promoviendo una conducta de búsqueda de placer y manteniendo un valor hedónico elevado del estímulo que limita la respuesta frente a la novedad.

Es importante destacar que los animales SL-CON-M mostraron un déficit persistente de SSS, previamente descrito en el DPN90 (Schumacher et al., 2023), lo que sugiere que la sobrealimentación neonatal por sí sola tiene efectos duraderos en estos mecanismos. El deterioro de la SSS puede ser la causa de las diferencias entre grupos en la ingesta de alimentos y apuntar a una alteración a largo plazo del procesamiento de la recompensa. Tal y como describen Gonzales et al. (2018, 2022), la SSS implica circuitos neuronales complejos que van más allá de la simple habituación.

En cuanto al comportamiento ansioso en los machos, reportes de nuestro grupo informaron un aumento en la ansiedad a causa de la sobrealimentación neonatal en DPN90 (Rossetti et al., 2024). En el presente estudio, este efecto ya no era evidente en el DPN130 en condiciones basales. Sin embargo, la combinación de sobrealimentación neonatal y exposición a CAF en la edad adulta (SL-CAF-M) condujo a un aumento sinérgico del IAn índice de ansiedad. Esto respalda la hipótesis de los “dos golpes” en la programación del desarrollo, según la cual las perturbaciones en las primeras etapas de la vida sensibilizan al sistema ante los retos de etapas posteriores, dejando al descubierto vulnerabilidades latentes (Deng et al., 2023). Mientras que algunos estudios informan de un aumento de la ansiedad tras la sobrealimentación neonatal (Amaro et al., 2023), otros observan una reducción de la ansiedad (Enes-Marques & Giusti-Paiva, 2018; Spencer & Tilbrook, 2009). Del mismo modo, las dietas CAF se han asociado con un comportamiento similar a la ansiedad (Bonfim et al., 2021; Ferreira et al., 2018). Nuestros resultados sugieren que los estímulos tempranos y tardíos producen conjuntamente una alteración conductual más robusta, haciendo posible extraer conclusiones sólidas respecto al fenotipo ansioso.

#### **5.4 REGULACIÓN DEL SISTEMA HOMEOSTÁTICO HIPOTALÁMICO: EXPRESIÓN GÉNICA Y MECANISMOS EPIGENÉTICOS**

La regulación homeostática de la ingesta en los machos, evidenció que la sobrealimentación temprana disminuyó la expresión hipotalámica de *Pomc* en el ARC, al menos en parte, a través de un mecanismo epigenético. También describimos que la sobrealimentación

neonatal disminuye la expresión del gen *Npy* en el ARC durante la edad adulta, aparentemente en respuesta a estímulos periféricos. Esto muestra un efecto a largo plazo sobre un neuropéptido que recientemente se ha propuesto como el vínculo entre los sistemas homeostático y hedónico de la ingesta de alimentos (Rezitis et al., 2022). La expresión del receptor de leptina en ARC se reduce como resultado de la dieta CAF. La inmunohistoquímica confirmó la presencia de la localización de la proteína *Pomc* en el ARC. Los análisis de expresión génica de neuropéptidos clave en el ARC revelaron una alteración de los mecanismos homeostáticos centrales que regulan la ingesta de alimentos en todos los grupos experimentales en relación con el control. Aunque todos desarrollaron obesidad, los mecanismos subyacentes parecen diferir, como lo demuestran los resultados descritos, que ponen de relieve los efectos duraderos de la sobrenutrición temprana. En este contexto, nuestro grupo de investigación demostró anteriormente que la dieta SL induce obesidad temprana, altera la regulación homeostática de la ingesta de alimentos y modifica el comportamiento alimentario relacionado con una respuesta ansiosa alterada (Rossetti et al., 2025; Schumacher et al., 2021). Estos efectos pueden revertirse en parte cambiando la dieta y podrían estar relacionados con cambios epigenéticos duraderos (Schumacher et al., 2021). La dieta CAF también generó una desregulación hipotalámica de la ingesta mediada por un patrón de metilación alterado, asociado con hiperleptinemia e hiperfagia (Lazarino et al., 2017, 2019).

En condiciones fisiológicas, la expresión de *Pomc* es activada por la leptina y la insulina a través de la vía de señalización STAT3, que es esencial para reducir la ingesta y aumentar el gasto energético (Vohra et al., 2022). En nuestro estudio, identificamos sitios de unión a STAT3 hipermetilados en las regiones promotoras y potenciadoras de *Pomc* en los grupos con sobrealimentación temprana, lo que podría afectar negativamente a la transcripción de *Pomc* y a su acción anorexígena.

Aunque la reducción de la expresión de *Pomc* y la hipermetilación del potenciador en los animales SL-CON-M predeciría teóricamente un aumento de la ingesta de alimentos, no se observaron diferencias significativas en la ingesta en relación con los animales NL-CON-M. Dado el papel central de las neuronas *Pomc* en el equilibrio energético, cabría esperar que estas alteraciones transcripcionales y epigenéticas afectarían al comportamiento alimentario. Por lo tanto, la ausencia de cambios medibles en el consumo sugiere la activación de mecanismos compensatorios —que podrían implicar vías hedónicas, señales hormonales periféricas o circuitos hipotalámicos paralelos— que podrían amortiguar los efectos de la desregulación de *Pomc*. Además, aunque confirmamos la presencia de la proteína *Pomc*

mediante tinción de inmunofluorescencia en ARC, se necesitan otros métodos para cuantificar la cantidad de proteína.

Por otra parte, la disminución de la expresión de *Npy*, un potente neuropéptido orexigénico, parece responder a los niveles más altos de grasa y, por consiguiente, de leptina, y podría reflejar un mecanismo de retroalimentación compensatorio (Plagemann et al., 2009; Vohra et al., 2022). Por el contrario, no se observaron alteraciones en la expresión de *Agrp* o *Cart*, lo que sugiere una vulnerabilidad selectiva dentro de la red neuropeptidérgica responsable del equilibrio energético, tal y como informaron (Lazzarino et al., 2019).

La exposición a la CAF provocó una disminución de la expresión del receptor de leptina, un hallazgo descrito anteriormente como característico de la resistencia central a la leptina a través de la vía clásica (Conceição et al., 2011; López et al., 2005; Zhang & Scarpance, 2006), una condición común en animales obesos (Lalanza & Snoeren, 2021). La resistencia a la leptina permite una alta ingesta calórica a pesar de los altos niveles circulantes de esta hormona, lo que crea un círculo vicioso: la obesidad promueve la resistencia a la leptina, que a su vez exacerba la obesidad (Zhang & Scarpance, 2006). Fenotípicamente, el grupo NL-CAF-M presentó obesidad acompañada de una disminución de la expresión del receptor de leptina, en consonancia con hallazgos anteriores (Lavoie et al., 2023; Lazzarino et al., 2019; Zhang & Scarpance, 2006). Del mismo modo, este grupo presentó hiperfagia, tal y como informaron otros autores (Buyukdere et al., 2019; Lalanza & Snoeren, 2021).

La sobrealimentación neonatal parece inducir una alteración en la programación temprana del hipotálamo, lo que genera una respuesta atenuada de las neuronas reguladoras de la ingesta a los cambios energéticos en la edad adulta (Marousez et al., 2019; Souza et al., 2022). Las reducciones en la expresión de *Pomc* y *Npy* observadas en animales SL-CAF-M indican una inhibición generalizada del tono neuronal hipotalámico, que afecta a las vías anorexigénicas (Vohra et al., 2022). La sobrealimentación temprana reduce la expresión de *Pomc* en el ARC en relación con modificaciones vinculadas a la memoria epigenética (Marousez et al., 2019; Rossetti et al., 2024; Schumacher et al., 2021; Souza et al., 2020, 2022).

Es de destacar que cuando la sobrealimentación neonatal se combina con la exposición a una dieta CAF en la edad adulta, también se observa un patrón compatible con la resistencia a la leptina. Estos resultados sugieren un comportamiento hiperfágico; sin embargo, en estos animales (SL-CAF-M), observamos una hipofagia sostenida a lo largo del periodo experimental relacionada con mecanismos compatibles con la anhedonia como se mencionó anteriormente. Una investigación reciente de McFadden (2023) demostró que la

manipulación directa de la metilación del ADN del promotor *Pomc* no era suficiente para prevenir o inducir un aumento de peso anormal en ratas expuestas a una dieta alta en grasas, lo que advierte que estas alteraciones son una consecuencia y no una causa de la obesidad. En conjunto, nuestros resultados sugieren la existencia de tres fenotipos diferenciados de obesidad en la edad adulta, cada uno asociado a mecanismos subyacentes específicos.

### **5.5 REGULACIÓN DEL SISTEMA HEDÓNICO MESOLÍMBICO: EXPRESIÓN GÉNICA Y SU INTERACCIÓN CON LA REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA**

La sobrealimentación neonatal generada por el modelo SL afecta a la función del circuito mesolímbico dopaminérgico cuando se expone a ratas macho a una dieta CAF en la edad adulta. Además, observamos que la exposición a una dieta CAF por sí sola en la edad adulta también afecta a la vía dopaminérgica, induce alteraciones a largo plazo en la regulación hedónica de la alimentación, incluyendo cambios en las vías relacionadas en VTA y NAc, pero de manera diferente, provocando efectos distintos en el comportamiento alimentario. Mientras que en el primer caso provoca anhedonia y ansiedad, en el segundo provoca un comportamiento de ansia similar al observado en las adicciones. La prueba de inmunomarcación reveló la presencia de la proteína TH en VTA, cualitativamente menor en NL-CAF-M, en concordancia con la disminución observada en la expresión de su ARNm.

En más detalle, en VTA, observamos una disminución de la expresión de TH y DRD2 en animales NL-CAF-M, confirmada por inmunofluorescencia, lo que sugiere una reducción de la síntesis de DA. En el NAcSH, encontramos un aumento de la expresión del ARN mensajero de DRD1 y DRD2, lo que podría reflejar una regulación compensatoria al alza en respuesta a la disminución de la entrada de DA, un patrón observado en estados similares a la adicción. El uso de una técnica refinada de micropunción permitió aislar con precisión las regiones de la corteza y el NAc, lo cual es fundamental dado su papel diferencial en el procesamiento de estímulos nuevos frente a los aprendidos (Bayassi-Jakowicka et al., 2021; Marinescu & Labouesse, 2024).

Anteriormente hemos observado que la sobrealimentación neonatal produce, al destete, un aumento de la expresión de TH y DRD1 en VTA junto con una disminución de DAT (Schumacher et al., 2023). Estos resultados muestran una clara activación de la vía dopaminérgica caracterizada por el aumento de la expresión de TH que catalizaría la producción de DA, junto con el aumento de los receptores DRD1, que influyen en su acción. La disminución de DAT en este núcleo, con su función de recaptación que busca eliminar la DA del espacio sináptico, contribuye a proporcionar una mayor biodisponibilidad de este neurotransmisor.

En el NAcSh, donde se procesan los estímulos novedosos, observamos un claro aumento de DAT, lo que interpretamos como el mecanismo compensatorio para contrarrestar la DA que llega a este núcleo efector desde el VTA. Estos resultados refuerzan la idea de que la sobrealimentación debida a la reducción de la camada puede considerarse un estímulo alimentario hedónico.

En el DPN167, no observamos modificaciones en los parámetros evaluados de la vía dopaminérgica mesolímbica entre NL-CON-M y SL-CON-M. Sin embargo, cuando los animales fueron expuestos a un nuevo estímulo alimentario hedónico, como la dieta CAF, reapareció el aumento de la expresión de DAT en el NAcSh (responsable del procesamiento de estímulos novedosos). Además, se observó un aumento en la expresión de DAT en el NAcC, el núcleo responsable de procesar los estímulos aprendidos.

En resumen, la sobrealimentación neonatal deja una huella que provoca que la respuesta a largo plazo a los estímulos hedónicos dé lugar a una desensibilización dopaminérgica. En esta línea, Blum et al. (2014) proponen la hipótesis del síndrome de deficiencia de recompensa, caracterizado por un mal funcionamiento del sistema de recompensa, que implica la interacción de potentes neurotransmisores y da lugar a un comportamiento de ansia anormal. Las pruebas obtenidas en estudios con animales y seres humanos respaldan la hipótesis de que múltiples circuitos cerebrales similares se alteran en la obesidad y la dependencia de las drogas y, en su mayor parte, implican la participación de circuitos de recompensa modulados por la DA en los comportamientos alimentarios patológicos (Blum et al., 2014). Nuestras observaciones en SL-CAF-M son coherentes con este modelo, ya que observamos hipofunción dopaminérgica y comportamiento similar a la ansiedad.

Si bien estas interpretaciones proporcionan un modelo coherente, reconocemos que algunos mecanismos siguen siendo especulativos y requieren más investigación. Queda por determinar si esta marca se produce a través de la metilación de los genes implicados y el papel de la vía serotoninérgica.

Sin embargo, al integrar estos resultados de aumento del DAT en núcleos clave del sistema mesolímbico junto con los observados en la ingesta de alimentos y en la prueba SSS comentada anteriormente, se podría inferir que lo que ocurre en los trastornos SL-CAF-M tiene similitudes con los comportamientos depresivos y con la anhedonia (Serretti, 2023). Reforzando esta línea de pensamiento, Zhu et al. (2023) demostraron que el tratamiento con un inhibidor de la DAT (propofol) es eficaz como anti-anhedónico (Zhu et al., 2023). Además, en la revisión de Son y Kim (2020), se menciona que uno de los fármacos que se utilizan actualmente para el tratamiento de la obesidad es la naltrexona EN/bupropion ER (Contrave).

El bupropión es un inhibidor de la recaptación de norepinefrina y DA que se utiliza para el tratamiento de la depresión y para dejar de fumar (Son & Kim, 2020).

Aunque tanto la sobrealimentación neonatal como la exposición a dieta CAF en la edad adulta afectan a la vía dopaminérgica del circuito mesolímbico de recompensa, parecen seguir vías diferentes. La primera estrategia utiliza el aumento de DAT en el NAc como agente extractor y eliminador de DA del espacio sináptico, mientras que la segunda afectaría directamente a la producción de DA en el VTA a través de la disminución de la expresión de TH. Estas diferencias podrían explicar las diferencias entre estos grupos en cuanto a la ansiedad y el comportamiento alimentario cuando se exponen a CAF.

El NPY, un péptido implicado en el control homeostático y hedónico de la ingesta, puede representar un mediador clave entre el sistema homeostático y el hedónico (Rezitis et al., 2022). En nuestro estudio, la expresión de NPY en ARC se redujo tanto en los animales SL-CON-M como en los SL-CAF-M, lo que sugiere un efecto a largo plazo de la sobrealimentación neonatal. Dadas las funciones del NPY en la motivación y la recompensa alimentarias, esta disminución puede contribuir a la hipofagia observada y a los cambios dopaminérgicos. Cabe destacar que el NPY interactúa con los sistemas de DA y serotonina, aunque aún no se han definido los circuitos exactos (Rezitis et al., 2022).

## **5.6 ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DEL EPM MEDIANTE RATRACK**

Respecto al análisis automatizado de este test con RaTrack, si bien mostró una elevada concordancia con la evaluación manual para los parámetros asociados a los brazos abiertos, se observaron discrepancias en la cuantificación del tiempo de permanencia en la región central y en los brazos abiertos. Esta diferencia podría atribuirse a la menor definición espacial de los límites de dichas regiones, lo que dificulta su segmentación precisa mediante algoritmos de procesamiento de imágenes basados en umbrales de píxeles. Asimismo, el área central representa una zona de transición en la que el animal suele presentar comportamientos ambiguos, como exploraciones parciales o desplazamientos rápidos entre regiones, lo que introduce variabilidad adicional tanto en el análisis manual como en el automatizado.

Estas observaciones sugieren que, si bien RaTrack constituye una herramienta prometedora para la evaluación de conductas clásicamente asociadas a ansiedad en el EPM, aunque requiere ajustes metodológicos adicionales. Por este motivo, se debe continuar perfeccionando la sensibilidad y la capacidad de discriminación del sistema, particularmente en los sectores donde los límites espaciales son menos definidos. Una fortaleza es explorar

alternativas complementarias basadas en algoritmos de inteligencia artificial y técnicas de visión computacional, con el propósito de optimizar la detección automática de las zonas del laberinto y mejorar la concordancia entre el análisis automatizado y la evaluación humana. Estas estrategias no solo buscan consolidar la herramienta como un recurso confiable y reproducible para el estudio del comportamiento en modelos animales, sino que también posibilitaron una experiencia enriquecedora que contribuyó a una formación científica integral en el marco del presente trabajo de tesis.

## **5.7 INTEGRACIÓN DE RESULTADOS Y ALCANCES DEL ESTUDIO**

En base a lo expuesto anteriormente, podemos decir que hay tres fenotipos de obesidad que responden a mecanismos diferentes: el primero se desarrolla impulsado por la exposición a una dieta CAF en la edad adulta, caracterizada por resistencia central a la leptina por reducción de la expresión del receptor de leptina y con conducta hiperfágica, asociada a respuesta dopaminérgica similar a la observada en las adicciones. El segundo, es el resultado de la sobrenutrición neonatal, marcada por la adiposidad perirrenal persistente, la represión epigenética de *Pomc* y la ingesta de alimentos sin cambios, posiblemente mantenida a través de la regulación compensatoria a la baja de NPY. Una tercera forma puede surgir de la combinación de la sobrenutrición temprana y la exposición a CAF en la edad adulta, presentando características de ambas condiciones, incluyendo la metilación del promotor *Pomc*, la resistencia a la leptina y el comportamiento alimentario alterado consistente con la anhedonia a nivel hedónico. Es importante señalar que, en este modelo combinado, la supresión de *Pomc* probablemente refleje una huella epigenética estable establecida anteriormente en la vida (por ejemplo, en DPN21 y DPN90), como ha demostrado anteriormente nuestro grupo (Schumacher et al., 2021, 2023), mientras que la resistencia a la leptina probablemente esté asociada con la acumulación de grasa visceral inducida por la dieta CAF.

Curiosamente, en la obesidad a largo plazo resultante de la sobrenutrición neonatal, el NPY parece seguir respondiendo al aumento de la adiposidad y la leptina circulante, mientras que el *Pomc* no responde debido a su silenciamiento inducido por la metilación. Por el contrario, en la obesidad inducida por CAF, el NPY deja de responder, probablemente como consecuencia de la resistencia a la leptina. En la obesidad de doble impacto, los efectos de la sobrealimentación neonatal parecen predominar, ya que la expresión de NPY se regula a la baja de manera similar a la observada en animales SL-CON-M.

Finalmente cabe resaltar que, estos hallazgos respaldan la idea de que la programación nutricional en las primeras etapas de la vida influye no solo en aspectos conductuales, sino

también en componentes moleculares de la regulación de la alimentación de diferentes maneras. Esto sugiere que los distintos orígenes de la obesidad pueden activar mecanismos reguladores distintos, lo que refuerza la necesidad de enfoques terapéuticos personalizados. Esto enfatiza la idea de que, a pesar de las exhaustivas investigaciones, nuestro conocimiento sobre el control central de la ingesta de alimentos sigue siendo incompleto, lo que refleja la complejidad de las redes neuroendocrinas involucradas.

En el presente estudio, si bien se incluyeron animales de ambos sexos para el análisis de las variables morfométricas, metabólicas y de ingesta alimentaria, los resultados obtenidos en hembras deben considerarse preliminares. Debido a limitaciones de tiempo y recursos, las determinaciones moleculares y otros análisis complementarios se realizaron exclusivamente en machos. No obstante, las muestras correspondientes a las hembras fueron conservadas para su análisis en una etapa posterior, lo que permitirá profundizar en la caracterización de posibles diferencias sexuales.

## **6 CONCLUSIÓN**

Como se ha descrito en estudios previos de nuestro grupo, la sobrealimentación neonatal generada por el modelo SL provocó la aparición temprana de obesidad y alteraciones metabólicas (Schumacher et al., 2023; Walf & Frye, 2007). Además, hemos demostrado que la sobrealimentación neonatal altera el circuito dopaminérgico mesolímbico, el comportamiento alimentario y el comportamiento ansioso en machos (Schumacher et al., 2021; Walf & Frye, 2007). Asimismo, nuestro grupo demostró que las alteraciones causadas por la sobrealimentación neonatal en las vías centrales de regulación de la ingesta de alimentos podrían revertirse con una dieta equilibrada (Schumacher et al., 2023). A pesar de ello, se encontraron alteraciones epigenéticas en algunas de las vías implicadas en la regulación de la ingesta (Schumacher et al., 2021, 2023). Alteraciones metabólicas y moleculares, especialmente en la regulación central de la ingesta de alimentos pudiendo estar mediados por modificaciones epigenéticas (González-Gaspar et al., 2021; Lazzarino et al., 2019).

Basándonos en estas pruebas, nuestra hipótesis postula que la exposición a la sobrealimentación neonatal deja una huella en la regulación central de la ingesta, que se manifiesta en una alteración del comportamiento alimentario cuando se expone a un estímulo hedónico en la vida adulta. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la sobrenutrición neonatal y/o la exposición adulta a la dieta CAF sobre el comportamiento alimentario y en la expresión de genes clave implicados en la regulación de la ingesta de alimentos a nivel cerebral. Así, comprender cómo el sistema nervioso afecta a la motivación, la cognición y el comportamiento proporciona información clave sobre la etiología del sobrepeso y la obesidad. La comprensión de estos mecanismos puede ayudarnos a adaptar las terapias para los orígenes multifactoriales de la obesidad.

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que muestra evidencia de cómo la sobrealimentación neonatal puede dejar marcas en el cerebro que se activan con un nuevo estímulo hedónico, lo que influye en el comportamiento alimentario. Los estudios futuros podrían centrarse en explorar otros circuitos neuronales implicados en la regulación de la ingesta de alimentos, como la serotoninérgica. Además, los resultados sugieren un interés particular en evaluar las modificaciones epigenéticas en áreas clave del cerebro implicadas en la homeostasis energética, lo que proporciona información valiosa sobre la relación entre la regulación neonatal y la regulación a largo plazo de la ingesta de alimentos.

Este estudio demuestra que la sobrealimentación neonatal induce modificaciones epigenéticas duraderas en las vías hipotalámicas que regulan el equilibrio energético, en

particular a través de la metilación del promotor *Pomc*, que persisten hasta la edad adulta y determinan la respuesta del organismo a estímulos obesogénicos, como CAF. En consecuencia, identificamos tres fenotipos distintos de obesidad con diferentes mecanismos neurobiológicos: la obesidad inducida por CAF, caracterizada por resistencia a la leptina, resistencia a la insulina e hiperfagia; la obesidad a largo plazo por sobrealimentación neonatal, con desregulación selectiva de neuropéptidos y resistencia a la insulina; y una forma combinada que presenta características de ambas condiciones junto con un comportamiento alimentario alterado.

Estos hallazgos subrayan la heterogeneidad de los orígenes de la obesidad y el impacto duradero de la programación nutricional temprana. También ponen de relieve la necesidad de intervenciones personalizadas que aborden tanto la regulación homeostática como la hedónica de la ingesta de alimentos, así como su integración con otros sistemas neuronales, incluida la vía serotoninérgica.

En este contexto, es imperativo trabajar desde múltiples frentes para lograr un cambio de paradigma que permita abordar la obesidad como una patología compleja que es, reivindicando su comprensión como una enfermedad crónica y multifactorial en la que intervienen muchos más factores que simplemente el peso.

Comprender los mecanismos por los que la nutrición postnatal temprana influye en la regulación del peso corporal en la edad adulta ofrecería la oportunidad de diseñar recomendaciones e intervenciones específicas para obtener beneficios a largo plazo.

Aunque se necesita más investigación, nuestros resultados proporcionan evidencia de los posibles mecanismos involucrados en el comportamiento alimentario que podrían ser de interés para la investigación de fármacos terapéuticos para tratar esta patología. Además, nuestros resultados resaltan la importancia del estilo de vida desde una edad temprana y sus consecuencias a largo plazo.

## 7 **BIBLIOGRAFÍA:**

Aiassa, V., Del Rosario Ferreira, M., Villafaña, N., & Eugenia D'Alessandro, M. (2022).  $\alpha$ -Linolenic acid rich chia seed modulates visceral adipose tissue collagen deposition, lipolytic enzymes expression, insulin signaling and GLUT-4 levels in a diet-induced adiposity rodent model. *Food Research International*, 156, 111164. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111164>

Allison, J., Kaliszewska, A., Uceda, S., Reiriz, M., & Arias, N. (2021). Targeting DNA Methylation in the Adult Brain through Diet. *Nutrients*, 13(11), 3979. <https://doi.org/10.3390/nu13113979>

Amaro, A., Sousa, D., Sá-Rocha, M., Ferreira-Junior, M. D., Rosendo-Silva, D., Saavedra, L. P. J., Barra, C., Monteiro-Alfredo, T., Gomes, R. M., De Freitas Mathias, P. C., Baptista, F. I., & Matafome, P. (2023). Postnatal Overfeeding in Rodents Induces a Neurodevelopment Delay and Anxious-like Behaviour Accompanied by Sex- and Brain-Region-Specific Synaptic and Metabolic Changes. *Nutrients*, 15(16), 3581. <https://doi.org/10.3390/nu15163581>

Argente-Arizón, 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(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0079-5>

Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: Perception and integration. *Nature Reviews Genetics*, 3(8), 589-600. <https://doi.org/10.1038/nrg862>

Bassett, D. R., & Craig, B. W. (1988). Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *Journal of Applied Physiology*, 64(3), 1249-1256. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.64.3.1249>

Bayassi-Jakowicka, M., Lietzau, G., Czuba, E., Steliga, A., Waśkow, M., & Kowiański, P. (2021). Neuroplasticity and Multilevel System of Connections Determine the Integrative Role of Nucleus Accumbens in the Brain Reward System. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9806. <https://doi.org/10.3390/ijms22189806>

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, M. R. (2018). Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology*, 159(7), 2596-2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>

Berthoud, H.-R. (2012). The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 478-487. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000602>

Berthoud, H.-R., Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2017). Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology*, 152(7), 1728-1738. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.050>

Bilibio, B. L. E., Dos Reis, W. R., Compagnon, L., De Batista, D. G., Sulzbacher, L. M., Pinheiro, J. F., Ludwig, M. S., Frizzo, M. N., Cruzat, V., & Heck, T. G. (2023). Effects of alternate-day fasting and time-restricted feeding in obese middle-aged female rats. *Nutrition*, *116*, 112198. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112198>

Blum, K., Thanos, P. K., & Gold, M. S. (2014). Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. *Frontiers in Psychology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00919>

Bonfim, T. H. F. D., Tavares, R. L., De Vasconcelos, M. H. A., Gouveia, M., Nunes, P. C., Soares, N. L., Alves, R. C., De Carvalho, J. L. P., Alves, A. F., Pereira, R. D. A., Cardoso, G. A., Silva, A. S., & Aquino, J. D. S. (2021). Potentially obesogenic diets alter metabolic and neurobehavioural parameters in Wistar rats: A comparison between two dietary models. *Journal of Affective Disorders*, *279*, 451-461. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.10.034>

Buyukdere, Y., Gulec, A., & Akyol, A. (2019). Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*, *7*, e6656. <https://doi.org/10.7717/peerj.6656>

Campos, A., Port, J. D., & Acosta, A. (2022). Integrative Hedonic and Homeostatic Food Intake Regulation by the Central Nervous System: Insights from Neuroimaging. *Brain Sciences*, *12*(4), 431. <https://doi.org/10.3390/brainsci12040431>

Canesini, G., Stoker, C., Galoppo, G. H., Durando, M. L., Tschopp, M. V., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M. M., & Ramos, J. G. (2018). Temperature- vs. estrogen-induced sex determination in *Caiman latirostris* embryos: Both females, but with different expression patterns of key molecules involved in ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, *259*, 176-188. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.024>

Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., & Nagy, T. R. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in Nutrition*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00010>

Cifuentes, L., & Acosta, A. (2022). Homeostatic regulation of food intake. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, *46*(2), 101794. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101794>

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), jne.12380. <https://doi.org/10.1111/jne.12380>

Conceição, E. P. S., Trevenzoli, I. H., Oliveira, E., Franco, J. G., Carlos, A. S., Nascimento-Saba, C. C. A., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2011). Higher White Adipocyte Area and Lower Leptin Production in Adult Rats Overfed During Lactation. *Hormone and Metabolic Research*, *43*(07), 513-516. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1275702>

Cornejo, M. P., Denis, R. G. P., García Romero, G., Fernández, G., Reynaldo, M., Luquet, S., & Perello, M. (2021). Ghrelin treatment induces rapid and delayed increments of food intake: A heuristic model to explain ghrelin's orexigenic effects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(19-20), 6689-6708. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03937-0>

Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(9), 775-790. <https://doi.org/10.1038/nrd1825>

De Andrade Silva, S. C., Da Silva, A. I., Braz, G. R. F., Da Silva Pedroza, A. A., De Lemos, M. D. T., Sellitti, D. F., & Lagranha, C. (2021). Overfeeding during development induces temporally-dependent changes in areas controlling food intake in the brains of male Wistar rats. *Life Sciences*, 285, 119951. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119951>

Deng, S., Xie, R., Kong, A., Luo, Y., Li, J., Chen, M., Wang, X., Gong, H., Wang, L., Fan, X., Pan, Q., & Li, D. (2023). Early-life stress contributes to depression-like behaviors in a two-hit mouse model. *Behavioural Brain Research*, 452, 114563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114563>

Doulberis, M., Papaefthymiou, A., Polyzos, S. A., Katsinelos, P., Grigoriadis, N., Srivastava, D. S., & Kountouras, J. (2020). Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinologica*, 45(3). <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.19.03058-X>

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*, 68(6), 789-798. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0594-8>

Fam, J., Clemens, K. J., Westbrook, R. F., Morris, M. J., & Kendig, M. D. (2022). Chronic exposure to cafeteria-style diet in rats alters sweet taste preference and reduces motivation for, but not 'liking' of sucrose. *Appetite*, 168, 105742. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105742>

Ferreira, A., Castro, J. P., Andrade, J. P., Dulce Madeira, M., & Cardoso, A. (2018). Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.07.014>

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>

Gomez-Smith, M., Karthikeyan, S., Jeffers, M. S., Janik, R., Thomason, L. A., Stefanovic, B., & Corbett, D. (2016). A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology & Behavior*, 167, 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.029>

González, A., Recio, S. A., Sánchez, J., Gil, M., & De Brugada, I. (2018). Effect of exposure to similar flavours in sensory specific satiety: Implications for eating behaviour. *Appetite*, 127, 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.05.015>

González, A., Sánchez, J., & De Brugada, I. (2022). Habituation as an underlying mechanism for Sensory Specific Satiety: An assessment using flavor consumption and preference in rats. *Appetite*, 169, 105821. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105821>

González-Gaspar, P., Macías-Carballo, M., Cadena-Mejía, T., Landa-Jiménez, M. A., Montes-González, F. M., López-Meraz, M. L., Beltran-Parrazal, L., & Morgado-Valle, C.

(2021). Analixity: An open source, low-cost analysis system for the elevated plus maze test, based on computer vision techniques. *Behavioural Processes*, 193, 104539. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104539>

Greash, Z., Elmajdoub, L., Fayad, E., & Almaaty, A. (2024). Possible relationship between pre-pregnancy maternal body mass index and offspring hippocampus: An experimental study in albino Wistar rat. *Open Veterinary Journal*, 14(11), 2924. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i11.21>

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. *The Journal of Nutrition*, 143(5), 553-562. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172825>

Hetherington, M. M. (1996). Sensory-specific satiety and its importance in meal termination. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20(1), 113-117. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00048-J](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00048-J)

Hildebrand, S., & Pfeifer, A. (2025). The obesity pandemic and its impact on non-communicable disease burden. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 477(5), 657-668. <https://doi.org/10.1007/s00424-025-03066-8>

Hoey, H., & Roche, E. (2024). Obesity a triple pandemic, the trillion-dollar disease: Prevention is imperative. *Global Pediatrics*, 7, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.gped.2024.100141>

Hou, M., Liu, Y., Zhu, L., Sun, B., Guo, M., Burén, J., & Li, X. (2011). Neonatal Overfeeding Induced by Small Litter Rearing Causes Altered Glucocorticoid Metabolism in Rats. *PLoS ONE*, 6(11), e25726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025726>

Janicka, L., Dajnowska, A., & Arciszewski, M. B. (2025). Role of Proopiomelanocortin (POMC) Derivatives in Body Weight Regulation: A Review of Current Knowledge and Significance in the Pathogenesis of Obesity in Mammals. *Medycyna Weterynaryjna*, 81(5), 221-230. <https://doi.org/10.21521/mw.6998>

Kadayifci, F. Z., Zheng, S., & Pan, Y.-X. (2018). Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4055. <https://doi.org/10.3390/ijms19124055>

Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(8), 765-776. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.015>

Khoury, M., Manlihot, C., & McCrindle, B. W. (2013). Role of the Waist/Height Ratio in the Cardiometabolic Risk Assessment of Children Classified by Body Mass Index. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(8), 742-751. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.01.026>

Kim, J., & Shin, W. (2014). How to Do Random Allocation (Randomization). *Clinics in Orthopedic Surgery*, 6(1), 103. <https://doi.org/10.4055/cios.2014.6.1.103>

Kim, Y. J., & Park, T. (2008). Genes are differentially expressed in the epididymal fat of rats rendered obese by a high-fat diet. *Nutrition Research*, 28(6), 414-422. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.03.015>

Klump, K. L., Kashy, D. A., Culbert, K. M., Sinclair, E. B., Hildebrandt, B. A., Van Huysee, J. L., O'Connor, S. M., Fowler, N., Johnson, A., & Sisk, C. L. (2021). The effects of puberty and ovarian hormone removal on developmental trajectories of palatable food and chow intake in female rats. *Physiology & Behavior*, 235, 113394. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113394>

Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. En P. C. Guest (Ed.), *Pre-Clinical Models* (Vol. 1916, pp. 69-74). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4)

Lalanza, J. F., Caimari, A., Del Bas, J. M., Torregrosa, D., Cigarroa, I., Pallàs, M., Capdevila, L., Arola, L., & Escorihuela, R. M. (2014). Effects Of A Post-Weaning Cafeteria Diet In Young Rats: Metabolic Syndrome, Reduced Activity And Low Anxiety-Like Behaviour. *PLoS ONE*, 9(1), e85049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085049>

Lalanza, J. F., & Snoeren, E. M. S. (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 122, 92-119. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.003>

Lavoie, O., Michael, N. J., & Caron, A. (2023). A critical update on the LEPTIN-MELANOCORTIN system. *Journal of Neurochemistry*, 165(4), 467-486. <https://doi.org/10.1111/jnc.15765>

Lazzarino, G. P., Acutain, M. F., Canesini, G., Andreoli, M. F., & Ramos, J. G. (2019). Cafeteria diet induces progressive changes in hypothalamic mechanisms involved in food intake control at different feeding periods in female rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 498, 110542. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110542>

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>

Lecube A., Azcona C., Azriel S., Baile JI., Barreiro E., Blay G., Cañadas O., Bourgon L., Carretero J., Carrillo L., Ciudin A., Codesal M., Cuatrecasas G., Coronado PJ., Estévez J., Ferraz I., Fernández-, Figares M<sup>a</sup>P., Fernández JM., Flores L., García I., Gimeno AM., González M<sup>a</sup>E., Granda J., Gualdrón M<sup>a</sup>A., de Hollanda A., Martínez E., Martínez AD., Miñambres I., Moizé V., Morales C., O'Connor C., Orive A., Ramírez, V., Romero M., Ruiz J., Salvador J., Serrano C., Soler MJ., Supervía M., Torremadé J., Turró R., Valentí V., Vicente, & G., Vilarrasa N., Malagón M<sup>a</sup>M. (2025). *2ª edición Guía Española GIRO: guía española del manejo integral y multidisciplinar de la obesidad en personas adultas*. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). <https://www.seedo.es/index.php/guia-giro>

Leica Microsystems. (2024). *Leica Application Suite X (LAS X)* (Versión LAS X Office) [Software].

- Leigh, S.-J., Kendig, M. D., & Morris, M. J. (2019). Palatable Western-style Cafeteria Diet as a Reliable Method for Modeling Diet-induced Obesity in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, (153). <https://doi.org/10.3791/60262>
- Lisboa, P. C., Miranda, R. A., Souza, L. L., & Moura, E. G. (2021). Can breastfeeding affect the rest of our life? *Neuropharmacology*, 200, 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>
- Lutter, M., & Nestler, E. J. (2009). Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *The Journal of Nutrition*, 139(3), 629-632. <https://doi.org/10.3945/jn.108.097618>
- Mahmood, S., Smiraglia, D. J., Srinivasan, M., & Patel, M. S. (2013). Epigenetic changes in hypothalamic appetite regulatory genes may underlie the developmental programming for obesity in rat neonates subjected to a high-carbohydrate dietary modification. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(6), 479-490. <https://doi.org/10.1017/s2040174413000238>
- Maric, I., Richard, J. E., Taing, L., Byun, S., Lopez-Ferreras, L., Qiu, Y., & Skibicka, K. P. (2025). Amygdala aromatase controls food intake, reward, and thermoregulation. *Molecular Metabolism*, 99, 102202. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2025.102202>
- Marinescu, A.-M., & Labouesse, M. A. (2024). The nucleus accumbens shell: A neural hub at the interface of homeostatic and hedonic feeding. *Frontiers in Neuroscience*, 18, 1437210. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1437210>
- Marousez, L., Lesage, J., & Eberlé, D. (2019). Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming? *Nutrients*, 11(12), 2966. <https://doi.org/10.3390/nu11122966>
- Mattar, P., Jaque, C., Teske, J. A., Morselli, E., Kerr, B., Cortés, V., Baudrand, R., & Perez-Leighton, C. E. (2023). Impact of short and long exposure to cafeteria diet on food intake and white adipose tissue lipolysis mediated by glucagon-like peptide 1 receptor. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1164047. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1164047>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: Insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- McFadden, T., Gaito, N., Carucci, I., Fletchall, E., Farrell, K., & Jarome, T. J. (2023). Controlling hypothalamic DNA methylation at the Pomc promoter does not regulate weight gain during the development of obesity. *PLOS ONE*, 18(4), e0284286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284286>
- Ministerio de Salud. (2023). *Guía de Práctica Clínica Nacional de Abordaje Integral de la Obesidad en personas adultas*.

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>

Myers, K. P. (2017). Sensory-specific satiety is intact in rats made obese on a high-fat high-sugar choice diet. *Appetite*, *112*, 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.01.013>

National Research Council (U.S.) (with Institute for Laboratory Animal Research (U.S.) & National Academies Press (U.S.)). (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed). National Academies Press.

Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A. H., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, *41*(1), 111-119. <https://doi.org/10.1258/002367707779399518>

Oliva, M. E., Ferreira, M. D. R., Vega Joubert, M. B., & D'Alessandro, M. E. (2021). *Salvia hispanica* L. (chia) seed promotes body fat depletion and modulates adipocyte lipid handling in sucrose-rich diet-fed rats. *Food Research International*, *139*, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109842>

Othman, Z. A., Zakaria, Z., Suleiman, J. B., Ghazali, W. S. W., & Mohamed, M. (2021). Anti-Atherogenic Effects of Orlistat on Obesity-Induced Vascular Oxidative Stress Rat Model. *Antioxidants*, *10*(2), 251. <https://doi.org/10.3390/antiox10020251>

Ouakinin, S. R. S., Barreira, D. P., & Gois, C. J. (2018). Depression and Obesity: Integrating the Role of Stress, Neuroendocrine Dysfunction and Inflammatory Pathways. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 431. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00431>

Palkovits, M. (with Brownstein, M. J.). (1988). *Maps and guide to microdissection of the rat brain*. Elsevier.

Pandit, R., Mercer, J. G., Overduin, J., La Fleur, S. E., & Adan, R. A. H. (2012). Dietary Factors Affect Food Reward and Motivation to Eat. *Obesity Facts*, *5*(2), 221-242. <https://doi.org/10.1159/000338073>

Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Elsevier.

Piché, M.-E., Tchernof, A., & Després, J.-P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, *126*(11), 1477-1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>

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. *The Journal of Physiology*, *587*(20), 4963-4976. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176156>

Plagemann, A., Roepke, K., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., & Dudenhausen, J. W. (2010). Epigenetic

malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *Journal of Perinatal Medicine*, 38(4). <https://doi.org/10.1515/jpm.2010.051>

Quirós Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M., Debarba, L. K., Mecawi, A. S., De Paula, F. J. A., Rodrigues Franci, C., Elias, L. L. K., & Antunes- Rodrigues, J. (2020). Sex differences in body composition, metabolism- related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiological Reports*, 8(20). <https://doi.org/10.14814/phy2.14597>

Reichelt, A. C., Morris, M. J., & Westbrook, R. F. (2014). Cafeteria diet impairs expression of sensory-specific satiety and stimulus-outcome learning. *Frontiers in Psychology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00852>

Rendina, D., Campanozzi, A., & De Filippo, G. (2019). Methodological approach to the assessment of the obesogenic environment in children and adolescents: A review of the literature. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 29(6), 561-571. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.02.009>

Rezitis, J., Herzog, H., & Ip, C. K. (2022). Neuropeptide Y interaction with dopaminergic and serotonergic pathways: Interlinked neurocircuits modulating hedonic eating behaviours. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 113, 110449. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110449>

Rodrigues, V. S. T., Moura, E. G., Peixoto, T. C., Soares, P. N., Lopes, B. P., Bertasso, I. M., Silva, B. S., Cabral, S. S., Kluck, G. E. G., Atella, G. C., Trindade, P. L., Daleprane, J. B., Oliveira, E., & Lisboa, P. C. (2022). The model of litter size reduction induces long-term disruption of the gut-brain axis: An explanation for the hyperphagia of Wistar rats of both sexes. *Physiological Reports*, 10(3). <https://doi.org/10.14814/phy2.15191>

Rolls, B. J., Rowe, E. A., Rolls, E. T., Kingston, B., Megson, A., & Gunary, R. (1981). Variety in a meal enhances food intake in man. *Physiology & Behavior*, 26(2), 215-221. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90014-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90014-7)

Rossetti, M. F., Schumacher, R., Canesini, G., Fernandez, P., Gaydou, L., Stoker, C., & Ramos, J. G. (2024). Neonatal overfeeding promotes anxiety, impairs episodic-like memory, and disrupts transcriptional regulation of hippocampal steroidogenic enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 134, 109739. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109739>

Rossetti, M. F., Schumacher, R., Canesini, G., Fernández, P., Gaydou, L., Stoker, C., & Ramos, J. G. (2025). Enriched environment exposure restores behavioral alterations and transcriptional dysregulation of hippocampal steroidogenic enzymes in a small litter model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 145, 110024. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2025.110024>

Rossetti, M. F., Schumacher, R., Lazzarino, G. P., Gomez, A. L., Varayoud, J., & Ramos, J. G. (2019). The impact of sensory and motor enrichment on the epigenetic control of steroidogenic-related genes in rat hippocampus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 485, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.025>

Rossetti, M. F., Varayoud, J., Lazzarino, G. P., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2016). Pregnancy and lactation differentially modify the transcriptional regulation of steroidogenic

enzymes through DNA methylation mechanisms in the hippocampus of aged rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 429, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.037>

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>

Salari, A.-A., Samadi, H., Homberg, J. R., & Kosari-Nasab, M. (2018). Small litter size impairs spatial memory and increases anxiety- like behavior in a strain-dependent manner in male mice. *Scientific Reports*, 8(1), 11281. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29595-0>

Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2011). Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*, 19(6), 1109-1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>

Schumacher, R., Rossetti, M. F., Canesini, G., Gaydou, L., Garcia, A. P., Lazzarino, G. P., Fernandez, P. R., Stoker, C., Carrió, M. J., Andreoli, M. F., & Ramos, J. G. (2023). Neonatal overfeeding alters the functioning of the mesolimbic dopaminergic circuitry involving changes in DNA methylation and effects on feeding behavior. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 122, 109451. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109451>

Schumacher, R., Rossetti, M. F., Lazzarino, G. P., Canesini, G., García, A. P., Stoker, C., Andreoli, M. F., & Ramos, J. G. (2021). Temporary effects of neonatal overfeeding on homeostatic control of food intake involve alterations in POMC promoter methylation in male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 522, 111123. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111123>

Serretti, A. (2023). Anhedonia and Depressive Disorders. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 21(3), 401-409. <https://doi.org/10.9758/cpn.23.1086>

Son, J. W., & Kim, S. (2020). Comprehensive Review of Current and Upcoming Anti-Obesity Drugs. *Diabetes & Metabolism Journal*, 44(6), 802-818. <https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0258>

Souza, L. L., De Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2020). Does early weaning shape future endocrine and metabolic disorders? Lessons from animal models. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11(5), 441-451. <https://doi.org/10.1017/s2040174420000410>

Souza, L. L., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2022). Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring. *Nutrients*, 14(10), 2045. <https://doi.org/10.3390/nu14102045>

Spencer, S. J., & Tilbrook, A. (2009). Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1133-1143. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.02.013>

Steele, E. M., O'Connor, L. E., Juul, F., Khandpur, N., Galastri Baraldi, L., Monteiro, C. A., Parekh, N., & Herrick, K. A. (2023). Identifying and Estimating Ultraprocessed Food Intake in the US NHANES According to the Nova Classification System of Food Processing. *The Journal of Nutrition*, 153(1), 225-241. <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2022.09.001>

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), e52130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052130>

Tchkonina, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metabolism*, 17(5), 644-656. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.008>

Teixeira, D., Ceconello, A. L., Partata, W. A., De Fraga, L. S., Ribeiro, M. F. M., & Guedes, R. P. (2019). The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. *Nutritional Neuroscience*, 22(4), 284-294. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1380892>

Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10(6), 679-689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>

Tsai, M., Asakawa, A., Amitani, H., & Inui, A. (2012). Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(9), 543. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.105570>

USDA. (2025). *Dietary Guidelines For Americans*. <https://www.fns.usda.gov/cnpp/dietary-guidelines-americans>

Van Galen, K. A., Ter Horst, K. W., & Serlie, M. J. (2021). Serotonin, food intake, and obesity. *Obesity Reviews*, 22(7), e13210. <https://doi.org/10.1111/obr.13210>

Vargas, M. R., Ferreira, M. D. R., Collins, P., & D'Alessandro, M. E. (2025). Astaxanthin obtained from freshwater crustaceans mitigates visceral adiposity by modulating adipose tissue lipogenesis and ameliorates dyslipidemia in high-sucrose diet fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 142, 109924. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2025.109924>

Velkoska, E., Cole, T. J., Dean, R. G., Burrell, L. M., & Morris, M. J. (2008). Early Undernutrition Leads to Long-Lasting Reductions in Body Weight and Adiposity Whereas Increased Intake Increases Cardiac Fibrosis in Male Rats<sup>1</sup>. *The Journal of Nutrition*, 138(9), 1622-1627. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1622>

Vigil, P., Meléndez, J., Petkovic, G., & Del Río, J. P. (2022). The importance of estradiol for body weight regulation in women. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 951186. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.951186>

Vohra, M. S., Benchoula, K., Serpell, C. J., & Hwa, W. E. (2022). AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology*, 915, 174611. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174611>

Volkow, N. D., Wang, G.-J., & Baler, R. D. (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(1), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>

Vucetic, Z., & Reyes, T. M. (2010). Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: Implications for the regulation of obesity. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 2(5), 577-593. <https://doi.org/10.1002/wsbm.77>

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322-328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>

White, C. L., Purpera, M. N., & Morrison, C. D. (2009). Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(5), R1464-R1472. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91015.2008>

World Health Organization. (2025, marzo 7). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Zhang, Y., & Scarpace, P. J. (2006). The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiology & Behavior*, 88(3), 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.038>

Zhu, X., Ottenheimer, D., & DiLeone, R. J. (2016). Activity of D1/2 Receptor Expressing Neurons in the Nucleus Accumbens Regulates Running, Locomotion, and Food Intake. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00066>

Zhu, X.-N., Li, J., Qiu, G.-L., Wang, L., Lu, C., Guo, Y.-G., Yang, K.-X., Cai, F., Xu, T., Yuan, T.-F., & Hu, J. (2023). Propofol exerts anti-anhedonia effects via inhibiting the dopamine transporter. *Neuron*, 111(10), 1626-1636.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.02.017>