

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“MECANISMOS NEURALES DE CONTROL DE LA INGESTA ENERGÉTICA: ASPECTOS RELACIONADOS CON LA VÍA HOMEOSTÁTICA, HEDÓNICA Y NEUROESTEROIDOGÉNICA”

Lic. Gisela Paola Lazzarino

Director de Tesis: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Co-director de Tesis: Dra. María Florencia Andreoli

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)



I S A L

2019

*A mis padres **Silvana** y **Angel**, por su amor incondicional, por darme raíces para crecer y alas para volar.*

*A mi hermana **Priscila**, por acompañarme y motivarme en cada paso que doy.*

*A mi nona **Chiche** y a mi abuela **Edis**, por estar presente en todo momento.*

Agradecimientos

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por darme un lugar y por la excelente formación académica recibida, no sólo a lo largo del Doctorado, sino también en mi carrera de grado.

A la ANPCyT y al CONICET, por brindarme los medios para realizar este trabajo de Tesis.

Al Dr. Enrique Luque, director del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), por brindarme este gran espacio de trabajo y poner a disposición los recursos e insumos necesarios para alcanzar los objetivos de esta Tesis.

A mi director, el Dr. Guillermo Ramos, por guiarme con sabiduría, brindándome las enseñanzas necesarias para poder concretar este trabajo de investigación. Por todo su apoyo y confianza, que me permitieron crecer tanto personal como profesionalmente.

A mi co-directora, la Dra. Ma. Florencia Andreoli, quien confió en mí desde el principio, por la dedicación y el apoyo constante, siempre dispuesta frente a mis inquietudes y necesidades. Por su gran paciencia, su cariño y sus consejos.

A las Mg. Liliana Contini, Dra. Olga Ávila y Prof. Stella Vaira del Departamento de Matemática por la dedicación y paciencia con la que me ayudaron en los análisis estadísticos y en la interpretación de resultados de la presente Tesis.

Al Dr. Matías Gerard, por su excelente predisposición y gran ayuda, particularmente con el uso de ese “monstruo” llamado R.

A todos mis amigos y compañeros del ISAL y de Clínica, con quienes compartí la mayor parte de mis días durante estos años, por estar siempre presentes y brindarme su apoyo, haciendo que trabajar sea más divertido a su lado.

A mis amigos de la vida, por acompañarme siempre, tanto en momentos buenos como difíciles. Gracias por brindarme su cariño incondicional, porque sin entender bien que hacía, siempre estuvieron ahí, dispuestos a apoyarme y a festejar cada logro con alegría.

A mi familia, por su apoyo constante a lo largo de todo este camino y por estar siempre y de manera incondicional a mi lado brindándome su cariño. Especialmente muchas gracias a mis padres, Silvana y Ángel, y a mi hermana Priscila, mis pilares y mi mayor sostén, por su amor incondicional, sus buenos consejos y por incentivar me siempre a dar lo mejor de mí y a conseguir todo lo que me propongo. Este gran logro también es de ustedes.

A las involuntarias protagonistas de esta Tesis, perdón y gracias.

Y a todos aquellos que quizás olvido mencionar, pero que de alguna manera formaron parte de esta importante etapa de mi vida.

A todos ellos, gracias por acompañarme a lograr esta meta y por ser parte de mi vida!

Publicaciones

- Gastiazoro, M.P.; Guerrero Schimpf, M.L.; Durando, M.; Lazzarino, G.P.; Andreoli, M.F.; Zierau, O.; Luque, E.H.; Ramos, J.G.; Varayoud, J. (2018) *Induction of uterine hyperplasia after cafeteria diet exposure*. Molecular and Cellular Endocrinology, 477:112-120.
- 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.
- Andreoli, M.F.; Stoker, C.; Lazzarino, G.P.; Canesini, G.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2016) *Dietary whey reduces energy intake and alters hypothalamic gene expression in obese phytoestrogen deprived male rats*. British Journal of Nutrition, 116(6):1125-33.
- 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.
- Andreoli, M.F.; Stoker, C.; Rossetti, M.F.; Lazzarino, G.P.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2016) *Dietary withdrawal of phytoestrogens resulted in higher gene expression of 3-beta-HSD and ARO but lower 5-alpha-R-1 in male rats*. Nutrition Research Journal, 36(9):1004-12.

Índice

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 LA PANDEMIA DE OBESIDAD.....	11
1.2 REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS Y DEL BALANCE ENERGÉTICO.....	12
1.2.1 Regulación periférica de la ingesta.....	13
1.2.2 Regulación central de la ingesta.....	15
1.2.2.1 Sistema homeostático de control de la ingesta alimentaria.....	15
1.2.2.2 Sistema de recompensa y su rol en el control de la ingesta.....	19
Mecanismos hedónicos y conducta alimentaria.....	24
Mecanismos hedónicos y conducta social.....	25
1.3 NEUROESTEROIDES.....	26
1.3.1 Vías de síntesis de los neuroesteroides: principales enzimas y proteínas implicadas.....	26
1.3.2 Neuroesteroides y su rol en el control de la ingesta.....	30
1.4 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	30
1.4.1 Mecanismos de metilación diferencial del ADN.....	31
1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE OBESIDAD: DIETA DE CAFETERÍA.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 ANIMALES.....	38
3.2 INTERVENCIÓN DIETARIA.....	38
3.3 TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA GLUCOSA.....	39
3.4 TESTS DE CONDUCTA.....	40
3.4.1 Test de saciedad sensorial específica (TSSS).....	40
3.4.2 Test de locomoción y test de interacción social.....	41
3.5 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y DISECCIÓN DE LOS CEREBROS COMPLETOS.....	42
3.6 OBTENCIÓN DE LAS REGIONES CEREBRALES DE INTERÉS: MICRODISECCIÓN.....	42
3.7 OBTENCIÓN Y DETERMINACIONES EN LAS MUESTRAS DE SUERO.....	44
3.8 OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS ADIPOSOS.....	44
3.9 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	45
Extracción de ARN total.....	45

	<i>Transcripción reversa (RT)</i>	45
	<i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR)</i>	45
3.10	ESTUDIOS DE EPIGENÉTICA.....	47
	<i>Análisis bioinformático</i>	47
	<i>Análisis del estado de metilación del ADN</i>	49
3.11	DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	49
	<i>Procesado histológico</i>	49
	<i>Inmunohistoquímica</i>	50
	<i>Diseño bioinformático, amplificación, clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión de los antígenos de ARO y 5α-R</i>	51
	<i>Expresión y purificación de los antígenos recombinantes</i>	52
	<i>Obtención, purificación y caracterización del anticuerpo policlonal mono específico de conejo</i>	53
3.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
4.	RESULTADOS.....	57
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA DIETA DE CAFETERÍA.....	57
4.1.1	<i>Efecto de la dieta CAF sobre la ingesta</i>	58
4.1.2	<i>Efecto de la dieta CAF sobre el peso corporal</i>	62
4.1.3	<i>Efecto de la dieta CAF sobre el peso de los parches de tejido adiposo</i>	62
4.1.4	<i>Efecto de la dieta CAF sobre parámetros metabólicos y niveles plasmáticos hormonales</i>	63
4.2	EFFECTO DE LA DIETA DE CAFETERÍA SOBRE LOS MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DE REGULACIÓN DE LA INGESTA A LO LARGO DEL TIEMPO.....	64
4.2.1	<i>La dieta CAF altera la expresión génica de neuropéptidos en núcleos hipotalámicos discretos</i>	64
4.2.2	<i>La dieta CAF altera la expresión génica de receptores hormonales en núcleos hipotalámicos discretos</i>	66
4.2.3	<i>Análisis in silico de las regiones reguladoras de los genes correspondientes a los neuropéptidos POMC, AgRP y NPY</i>	68
4.2.4	<i>La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones reguladoras de los neuropéptidos POMC y NPY</i>	69
4.3	EFFECTO DE LA DIETA DE CAFETERÍA SOBRE LOS MECANISMOS HEDÓNICOS DE REGULACIÓN DE LA INGESTA A LO LARGO DEL TIEMPO.....	70
4.3.1	<i>Efecto de la dieta CAF sobre la expresión de diversos genes en áreas del cerebro pertenecientes al sistema de recompensa</i>	70
4.3.1.1	<i>Sistema dopaminérgico</i>	70
4.3.1.2	<i>Sistema GABAérgico</i>	72
4.3.1.3	<i>Sistema opioide</i>	73
4.3.1.4	<i>Sistema de orexinas</i>	74

4.3.1.5 Receptores hormonales.	75
4.3.2 Análisis <i>in silico</i> de las regiones reguladoras de los genes correspondientes a las moléculas del sistema dopaminérgico: TH, DRD1, DRD2 y DAT.	77
4.3.3 La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones regulatorias de DAT.	78
4.3.4 Efecto de la dieta CAF sobre la saciedad sensorial específica.	79
4.3.5 Efecto de la dieta CAF sobre la locomoción y la interacción social.	82
4.4 EFECTO DE LA DIETA CAF SOBRE LA VÍA NEUROESTEROIDOGÉNICA EN EL HIPOTÁLAMO.	83
4.4.1 La dieta CAF produce cambios en la expresión génica de enzimas neuroesteroidogénicas en PVN y VMN.	83
4.4.2 La dieta CAF altera la expresión de receptores de hormonas esteroides.	85
4.4.3 La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones regulatorias de enzimas neuroesteroidogénicas en PVN, pero no en VMN.	86
4.4.4 Desarrollo de anticuerpos policlonales para la detección de ARO y 5 α -R.	88
4.4.4.1 Diseño y obtención de antígenos específicos.	88
4.4.4.2 Generación y caracterización de los anticuerpos policlonales.	90
4.4.4.3 Expresión proteica de ARO y 5 α R en núcleos hipotalámicos relacionados al control homeostático de la ingesta.	91
4.5 EFECTO DE LA OBESIDAD MATERNA SOBRE LAS ÁREAS CEREBRALES INVOLUCRADAS EN EL CONTROL HOMEOSTÁTICO Y HEDÓNICO DE LA INGESTA EN LA PROGENIE (F1) – OBJETIVO 7.	94
4.5.1 Efecto de la dieta materna sobre el peso corporal de la progenie.	94
4.5.2 Efecto de la dieta materna sobre los mecanismos homeostáticos de control de la ingesta en la progenie.	94
4.5.2.1 Efecto sobre la expresión de neuropéptidos.	94
4.5.2.2 Efecto sobre la expresión génica de receptores hormonales.	95
4.5.2.3 Efecto de la dieta materna sobre los mecanismos hedónicos de control de la ingesta en la progenie.	96
<i>La dieta materna CAF modifica la expresión génica de moléculas claves implicadas en el sistema dopaminérgico de la progenie.</i>	96
<i>La dieta materna CAF varía la expresión génica de las enzimas involucradas en la síntesis de GABA en la descendencia.</i>	97
<i>La dieta materna CAF afecta la expresión de moléculas implicadas en el sistema opioide en la descendencia.</i>	98
<i>La dieta materna CAF afecta la expresión de moléculas relacionadas al sistema de OX en la descendencia.</i>	99
<i>La dieta materna CAF altera la expresión génica de los receptores hormonales en la descendencia.</i>	100

	<i>La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones regulatorias de moléculas clave de la vía dopaminérgica en ATV y NAc.</i>	101
4.5.2.4	<i>Efecto de la dieta materna CAF sobre la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas en el hipotálamo de la progeñe.</i>	103
5.	DISCUSIÓN	106
	<i>La dieta CAF altera la ingesta e incrementa la adiposidad, el peso corporal y los niveles de leptina circulante.</i>	106
	<i>La dieta CAF altera los circuitos cerebrales homeostáticos de control de ingesta</i>	110
	<i>Efecto de la duración de la intervención dietaria sobre el sistema homeostático de control de ingesta.</i>	113
	<i>Efecto de la dieta CAF sobre el sistema de recompensa cerebral.</i>	114
	<i>Efecto de la longitud dietaria sobre la expresión de los distintos componentes del sistema de recompensa.</i>	121
	<i>La dieta CAF altera la expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas y de los receptores hormonales esteroides.</i>	121
	<i>Efecto de la duración de la intervención dietaria sobre la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas y receptores hormonales esteroides</i>	124
	<i>Efecto de la dieta materna CAF sobre la progeñe.</i>	125
	<i>La dieta materna CAF disminuyó significativamente el peso corporal de la progeñe desde el nacimiento hasta el DPN10.</i>	125
	<i>La dieta materna CAF altera la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas en hipotálamo de la progeñe en DPN10.</i>	130
	<i>Efecto de la edad sobre la expresión de genes en la progeñe</i>	130
6.	CONCLUSIONES	133
7.	BIBLIOGRAFÍA	136

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α -MSH	Hormona Estimuladora de Melanocitos alfa (α)
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetros
17 β -HSD-3	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3
3V	Tercer ventrículo
3 α -HSD	3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ 5- Δ 4 isomerasa
5 α -R	Esteroides 5 α -reductasa 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AgRP	Péptido relacionado al Agouti
ARC	Núcleo Arcuato del hipotálamo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARO	Citocromo P450 aromatasa
ATF-	Factor de activación transcripcional -
ATV	Área Tegmental Ventral
BLA	Amígdala Baso-lateral
C	Dieta control
C11	Hembras alimentadas con dieta control por 11 semanas
C20	Hembras alimentadas con dieta control por 20 semanas
C4	Hembras alimentadas con dieta control por 4 semanas
CAF	Dieta de cafetería
CAF11	Hembras alimentadas con dieta de cafetería por 11 semanas
CAF20	Hembras alimentadas con dieta de cafetería por 20 semanas
CAF4	Hembras alimentadas con dieta de cafetería por 4 semanas
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CART	Transcripto relacionado a las Anfetaminas y Cocaína
CeA	Núcleo Central de la Amígdala
Cm	Centímetros
CRE	proteínas de unión a AMPc
CREB	Proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina

Ct	Ciclo umbral
DA	Dopamina
DAB	Diaminobencidina
DAT	Transportador Activo de Dopamina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMN	Núcleo Dorsomediano del hipotálamo
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
DPN	Día post-natal
DRD1	Receptor de Dopamina 1
DRD2	Receptor de Dopamina 2
E	Día embrionario
Ef	Eficiencia
E ₂	17β-Estradiol
F1	Progenie
FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>
GABA	Ácido gamma (γ)-aminobutírico
GAD1	Glutamato Decarboxilasa 1
GAD2	Glutamato Decarboxilasa 2
GATA	Proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides
GhSR	Receptor de Ghrelina
GRE	Elemento de respuesta a los glucocorticoides
GST	Glutation-S-transferasa
HCRTR1	Receptor de Orexina 1
HCRTR2	Receptor de Orexina 2
HL	Hipotálamo Lateral
HOMA	Homeostatic Model Assessment
HSD	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
IHQ	Inmunohistoquímica
INH	Inhibidor
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ipGTT	Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa
kDa	Kilodaltons
MCH	Hormona concentradora de melanina
MOR	Receptor Mu (μ) de Opioides
mPFC	Corteza media prefrontal
MSRE-PCR	Digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR en tiempo real

NAc	Núcleo Accumbens
NAcC	Núcleo Accumbens núcleo
NAcSh	Núcleo Accumbens corteza
NF-1	Factor nuclear 1
NF-AT	Factor nuclear de células T activadas
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento nervioso
nGRE	Factor de transcripción negativo del elemento sensible a glucocorticoides
NHS	N-hidroxisuccinamida
NPY	Neuropéptido Y
NRE	Elemento de Receptor Nuclear
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
ObRb	Isoforma larga del Receptor de Leptina
Oct-1	Factor de unión a octámeros 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
OX	Orexinas
P450(11 β)-1	11 β -hidroxilasa
P450(11 β)-2	Aldosterona sintasa
P450(17 α)	Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa
P450scc	Citocromo P450scc
Pb	Pares de bases
pmoles	Picomoles
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular del hipotálamo
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
RE α	Receptor de Estrógenos α
RIns	Receptor de Insulina
RP	Receptor de progesterona
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa luego de una transcripción reversa
SEM	Error estándar de la media
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SNC	Sistema Nervioso Central
Sp1	Factor promotor selectivo 1
SREBP	Proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides
StAR	Proteína de la regulación esteroideogénica aguda
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción

TAPg	Tejido adiposo perigonadal
TARP	Tejido adiposo retroperitoneal
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TBST	Solución tampón Tris con Tween
TH	Tirosina Hidroxilasa
TRH	Hormona liberadora de tirotrofina
TSSS	Test de Saciedad Sensorial Específica
VMN	Núcleo Ventromediano del hipotálamo
VP	Ventral Pallidum

RESUMEN

Hoy en día la obesidad es la mayor amenaza para la salud pública en el mundo desarrollado. La dieta de cafetería (CAF) es un modelo dietario experimental para roedores que refleja con precisión la variedad de alimentos de alta palatabilidad y densos en energía que prevalecen en la sociedad occidental. La ingesta de alimentos es regulada principalmente mediante dos sistemas: homeostático y no homeostático o hedónico. El primero se relaciona principalmente con el control hipotalámico de la ingesta, que regula el balance de energía mediante el aumento de la motivación para comer tras el agotamiento de las reservas. El control hedónico se produce principalmente a través del circuito de recompensa cerebral, y puede anular la vía homeostática durante los períodos de abundancia relativa de energía aumentando el deseo de consumir alimentos que son muy apetecibles. Además, los esteroides también pueden afectar la ingesta de alimentos. Ha sido reportado que varias enzimas neurosteroidogénicas se expresan en el hipotálamo, aunque la relación entre sus niveles y el estado metabólico o dietario de los animales resulta desconocida. Así, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar cómo una dieta CAF administrada a corto, mediano y largo plazo afecta a los mecanismos cerebrales homeostáticos y hedónicos que regulan la ingesta de alimentos, al igual que su influencia sobre la neurosteroidogénesis hipotalámica. Además, analizamos si estos cambios podrían ser transmisibles transgeneracionalmente por mecanismos no genómicos de naturaleza epigenética. Para esto ratas Wistar hembra fueron alimentadas con alimento balanceado o dieta CAF desde el destete y durante 4 (corto plazo), 11 (medio plazo) o 20 (largo plazo) semanas. Los animales fueron sometidos a tests de saciedad sensorial específica, de locomoción y de interacción social. Luego de 14 semanas, hembras de cada grupo dietario fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada, y mantenidas en sus respectivas dietas durante el embarazo y la lactancia, hasta el día embrionario 21 (E21) o el día postnatal 10 (DPN10) cuando las crías hembra fueron sacrificadas. Luego de cumplida la intervención dietaria los animales fueron eutanizados y los cerebros fueron extraídos. Los niveles de ARNm de los neuropéptidos hipotalámicos relacionados con la ingesta y los genes claves de la vía de recompensa se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en núcleos cerebrales discretos, aislados mediante la técnica de micropunción. Además, la expresión de enzimas neurosteroidogénicas y receptores hormonales fue evaluada mediante inmunohistoquímica y qPCR en núcleos hipotalámicos discretos. La técnica de digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación seguida de qPCR fue utilizada para estudios epigenéticos. Las hormonas séricas fueron dosadas mediante radioinmunoensayo.

A corto plazo, la dieta CAF incrementó el consumo de energía y la adiposidad sin afectar el peso corporal. El aumento en la ingesta energética a corto plazo en los animales CAF se relacionó con cambios en los mecanismos de recompensa cerebral: se encontró un incremento en la expresión del transportador activo de dopamina (DAT) y una disminución en ambas isoformas

de la enzima glutamato descarboxilasa en el área tegmental ventral (ATV), mientras que en el núcleo Accumbens (NAc) se observó una disminución en la expresión del receptor de dopamina (DRD) 2 en la corteza (NAcSh) y un aumento de los niveles de DRD1 en el núcleo (NAcC). Los cambios en el ARNm de DAT se relacionaron con una disminución en el estado de metilación de su región promotora. Estos cambios podrían estar vinculados a alteraciones en la saciedad sensorial específica, el juego social, el comportamiento exploratorio y los niveles de ansiedad. A mediano plazo, los animales alimentados con CAF mantuvieron la ingesta energética alta e incrementaron aún más la adiposidad, lo que llevó a un estado de hiperleptinemia y sobrepeso. Estose relacionó con una señal orexígena proveniente del Hipotálamo Lateral (HL), y de los núcleos paraventricular (PVN) y ventromediano (VMN) del hipotálamo, dada principalmente por el incremento en la expresión de los neuropéptidos orexígenos Orexinas (OX), proteína relacionada al Agouti (AgRP) y Neuropéptido Y (NPY). Esta acción fue contrarrestada por un aumento en los niveles de proopiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo. Además, la dieta CAF alteró la expresión de enzimas neurosteroidogénicas en el hipotálamo: en PVN los niveles de 5α -reductasa 1 disminuyeron y aumentaron los de la citocromo p450 Aromatasa (ARO), mientras que en VMN las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y ARO aumentaron su expresión. Todos estos resultados se asociaron con cambios en los niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes, indicando que mecanismos epigenéticos podrían estar involucrados. A largo plazo, los cambios observados a nivel metabólico y en las vías homeostática y neurosteroidogénica en los animales CAF se incrementaron, llevando a un estado de obesidad. A esto se suma una alteración en los niveles de AgRP: este neuropéptido duplicó su expresión en PVN mientras que disminuyó sus niveles en ARC. Además, se encontró un aumento en la expresión de la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HSD) en VMN. Por otro lado, el estudio de la progenie demostró que la dieta materna CAF disminuyó significativamente el peso corporal de las crías y afectó al sistema homeostático, ya que la expresión de POMC se redujo en E21, cambio que se mantuvo en PND10. La vía dopaminérgica de la progenie también se vio afectada en DPN10: la dieta materna CAF disminuyó la transcripción de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH), DRD2 y DAT en ATV. Además, los cambios en la expresión de TH y DRD2 se relacionaron con el estado de metilación de sus regiones promotoras. En NAc, la dieta materna CAF redujo la expresión de DRD1 y DRD2 en DPN10, aunque no se detectaron alternancias en sus patrones de metilación.

Nuestros resultados muestran que una ingesta de una dieta de alta palatabilidad desde etapas tempranas de la vida altera de manera diferencial los sistemas cerebrales involucrados en el control de la ingesta, según la duración de la intervención dietaria. Una ingesta a corto plazo de CAF altera al sistema de recompensa cerebral, al menos en parte mediante cambios epigenéticos, reflejando un estado de hiposensibilidad a la recompensa que podría promover el consumo excesivo de alimentos de alta palatabilidad para compensarlo. La desregulación de las vías

homeostática y neuroesteroidogénica observada en los animales CAF juega un papel importante en el control de la ingesta a mediano plazo, llevando a un estado de sobrepeso. Estos cambios se exacerban a largo plazo, al manifestarse un estado de obesidad. Los cambios observados a nivel epigenético en los animales alimentados con CAF a mediano y largo plazo nos sugieren que una ingesta prolongada de esta dieta podría afectar diferencialmente el patrón de metilación del ADN de las regiones promotoras de los genes en núcleos hipotalámicos discretos. Además, algunos de los cambios observados serían transmisibles transgeneracionalmente. Finalmente, resulta esencial identificar los cambios en la expresión génica al comienzo del desarrollo de la obesidad, para poder predecir la trayectoria de esta patología y así elegir una terapia eficaz.

ABSTRACT

Obesity plays a worldwide threat for population health. Cafeteria diet (CAF) is an experimental rodent diet model that accurately reflects the variety of highly palatable and energy dense foods prevalent in Western society. Food intake is regulated by two complementary drives: the homeostatic, which controls energy balance, and reward-based (RW) pathways, activated during periods of relative energy abundance. Besides, steroids may also affect food intake. It was reported that several neurosteroidogenic enzymes are expressed in the hypothalamus, although the relationship between their expression and the metabolic or dietary status of the animals remains unknown. The aim of the thesis was to evaluate how a CAF diet administered for a short, medium and long term affects the homeostatic and hedonic brain mechanisms that regulate food intake, as well as its influence on hypothalamic neurosteroidogenesis. Besides, we want to analyze whether these changes could be transmissible transgenerationally. Female rats were fed chow or CAF from weaning and for 4 (short-term), 11 (medium-term) or 20 (long-term) weeks. The animals were subjected to sensory specific satiety, locomotion, and social interaction tests. After 14 weeks, a group of females were mated with males and maintained on their respective diets throughout pregnancy and lactation. Female offspring were sacrificed on embryonic day 21 (E21) or postnatal day 10 (PND10). Animals were euthanized and brains were removed. The mRNA levels of feeding related neuropeptides and key genes of the reward pathway were analysed by qPCR in discrete brain nuclei isolated by micropunching technique. Besides, the expression of neurosteroidogenic enzymes and hormone receptors was evaluated by immunohistochemistry and qPCR in discrete hypothalamic nuclei. Thus, specific antibodies were produced. Digestion with methylation-sensitive restriction enzymes followed by qPCR was used for epigenetic studies. Serum hormones were assessed by radioimmunoassay.

In the short-term, CAF increased energy intake and adiposity without affecting body weight. The increase in energy intake was related to RW mechanisms: CAF enhanced dopamine active transporter (DAT) and decreased both isoforms of glutamate decarboxylase levels in Ventral Tegmental Area (VTA), while decreased dopamine receptor (DRD) 2 expression in Nucleus Accumbens (NAc) Shell and increased DRD1 levels in NAc Core. The changes in DAT mRNA were related to a decrease in the methylation status of its promoter region. Furthermore, CAF animals demonstrate impaired sensory-specific satiety, social play, exploratory behavior and anxiety levels. In the medium-term, CAF animals sustained the hyperenergetic intake and further increased adiposity, leading to hyperleptinemia and higher body weight. These results were in line with an orexigenic signal of Lateral Hypothalamus, paraventricular (PVN) and ventromedial (VMN) nuclei, given principally by upregulation of the orexigenic neuropeptides: Orexin, agouti-related protein (AgRP) and Neuropeptide Y, which was counteracted by increased Proopiomelanocortin (POMC) levels in the Arcuate nucleus (ARC). CAF altered the transcription of neurosteroidogenic enzymes: in PVN 5 α -Reductase 1 levels decreased, and cytochrome

p450Aromatase (ARO) increased, while in VMN 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and ARO expression increased. All these results were associated with differential gene promoter methylation, indicating that epigenetic mechanisms were involved. In the long-term, CAF animals enhanced the alterations of the homeostatic and neurosteroidogenic pathways observed in the medium-term. Also changes in AgRP were found: this neuropeptide doubled its expression in PVN while decrease its levels in ARC. Besides, an increased expression of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in VMN was found. The study of the offspring showed that maternal CAF significantly decreased the body weight of pups and affected the homeostatic system as the expression of POMC was reduced in E21 and remained lower at PND10. The dopaminergic pathway was also affected in PND10: maternal CAF decreased the transcription of tyroxine hydroxylase (TH), DRD2, and DAT in VTA. The changes in TH and DRD2 expression were related to the methylation status of their promoter regions. In NAc, maternal CAF diet reduced DRD1 and DRD2 expression in the offspring at PND10; although no alternations in their methylation patterns were detected.

Our results show that the intake of CAF from early-stages of life differentially alters the brain systems involved in food intake control depending on dietary intervention. A short-term intake of CAF deregulates the RW, at least in part via epigenetic changes, possibly reflecting a state of RW hyposensitivity, which might promote the excessive intake of palatable foods to compensate this status. The deregulation of the homeostatic and neurosteroidogenic pathways play an important role at a medium-term feeding with CAF, leading to an overweight status, and is exacerbated in the long-term, when obesity is already manifested. The epigenetic changes observed in the animals fed with CAF in the medium and long-term suggest that an extended intake of this diet could differentially affect the DNA methylation pattern of the promoter regions in discrete hypothalamic nuclei. Furthermore, these changes are transmissible transgenerationally. Finally, it is essential to identify alterations in gene expression at the very beginning of obesity development, in order to predict this pathology's trajectory and be able to choose an effective therapy.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PANDEMIA DE OBESIDAD.

El sobrepeso y la obesidad son trastornos crónicos multifactoriales definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que supone un riesgo para la salud [1] y que se dan como resultado de las interacciones entre el estilo de vida, diversos factores neuroendocrinos y de la predisposición genética [2]. Implican un incremento de las reservas energéticas del organismo en forma de grasa, que se acompaña por un aumento en la masa corporal total, como consecuencia de un balance energético positivo mantenido en el tiempo [3]. De esta manera, es probable que su causa más importante sea el exceso en la ingesta, el cual se encuentra estimulado por la gran disponibilidad de alimentos ricos en grasas y azúcares, junto con la inactividad física. Estos trastornos constituyen factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas no transmisibles, entre las que se incluyen la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, hiperlipidemia, complicaciones respiratorias e irregularidades reproductivas y una mayor incidencia de ciertas formas de cáncer [4,5].

Alguna vez considerados problemas de países desarrollados, tanto el sobrepeso como la obesidad están en aumento en los países en vías de desarrollo, especialmente en las áreas urbanas, presentando una gran amenaza para la salud pública en el mundo y una preocupación creciente para los organismos de salud, dado que afectan a un gran porcentaje de la población, sin discriminar edad, sexo, o condición social [3]. Según la OMS es posible estimar que cada año fallecen alrededor de 3,4 millones de personas adultas en el mundo como consecuencia del exceso de peso y la obesidad. En el año 2016, el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas (OMS, 2018). En Argentina la 3° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo de enfermedades no transmisibles realizada en 2013 reveló que aproximadamente 4 de cada 10 personas mayores de 18 años tenían sobrepeso y 2 de cada 10 presentaron obesidad [6,7].

La obesidad en el embarazo trae consecuencias adversas muy marcadas [8-10]. Las mujeres que tienen sobrepeso u obesidad en la concepción tienen mayor probabilidad de desarrollar complicaciones hipertensivas, diabéticas o preeclampsia, entre otras [11]. Sin embargo, las evidencias relacionadas con las consecuencias de la obesidad materna sobre la salud de la descendencia son menos claras. En este contexto, una serie de estudios epidemiológicos y experimentales a nivel mundial ha demostrado que la susceptibilidad de un individuo a la obesidad puede tener sus orígenes en una etapa temprana de la vida y puede verse influenciada por la experiencia nutricional durante períodos críticos del desarrollo fetal y postnatal temprano [12]. Existe una buena evidencia clínica y experimental de que las personas expuestas a un suministro elevado de nutrientes en el útero como consecuencia de la sobrealimentación, la diabetes materna, o la obesidad materna tienen un mayor riesgo de padecer obesidad a lo largo de

su vida [8]. Esto es particularmente relevante ya que ha sido reportado que hasta un 30% de los embarazos en los países desarrollados sufrieron complicaciones como consecuencia de la obesidad materna [13]. El papel del desarrollo en estadios tempranos de vida sobre la salud posterior se ha denominado “programación fetal” y se define como el proceso por el cual un estímulo durante un período crítico de desarrollo da lugar a consecuencias fisiológicas en el largo plazo [14]. De acuerdo a este paradigma, la variación de la nutrición materna en un periodo crítico podría alterar el consumo de energía en la descendencia a través de cambios en la expresión y acción de moléculas implicadas en la regulación del apetito [15,5,16]. Estudios en roedores muestran que la descendencia de madres alimentadas con una dieta obesogénica presentan alteraciones en la homeostasis del metabolismo de la glucosa y los lípidos, como así también mayor adiposidad [17,18]. De esta manera, la alimentación con dietas hiperenergéticas y la consecuente obesidad durante la preñez pueden conducir a alteraciones permanentes en la función fisiológica postnatal de la progenie, promoviendo la adiposidad.

Por todo lo anteriormente expuesto el estudio de los mecanismos que regulan el balance energético es esencial para el entendimiento, la prevención y el tratamiento de la obesidad.

1.2 REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS Y DEL BALANCE ENERGÉTICO.

Todo organismo vivo precisa un aporte de nutrientes para el adecuado crecimiento, desarrollo y mantenimiento de sus tejidos, que es obtenido gracias a la ingesta alimentaria. Ésta depende no sólo de distintas señales hormonales, neurales y metabólicas, sino también de otros factores - como la apariencia de la comida, el sabor, la disponibilidad y los aspectos socioculturales y económicos - que la rigen y regulan. El mantenimiento del peso corporal requiere que la cantidad de energía ingerida se ajuste de forma precisa a la cantidad de energía consumida. Aunque el complejo mecanismo que lo regula se ve influenciado por factores medioambientales que hacen la cantidad de energía ingerida no se correlacione en muchas ocasiones con el gasto energético diario, la mayoría de las personas ajustan la ingesta energética y el gasto con gran precisión [19]. Este fenómeno refleja la existencia de un proceso de regulación activo, denominado homeostasis de energía, que involucra señales tanto periféricas como centrales y que promueve la estabilidad en la cantidad de energía corporal almacenada en forma de grasa. Un hecho relevante en la regulación del metabolismo y del balance energético es la existencia de una interacción multifactorial entre estímulos aferentes nutricionales, endocrinos y metabólicos, provenientes del sistema gastrointestinal, y eferentes, producidos por el Sistema Nervioso Central (SNC) en respuesta a las señales periféricas, que establecen un equilibrio entre el apetito y la saciedad y que contribuyen a ajustar el gasto energético [20]. El sistema gastrointestinal y el SNC se comunican mediante múltiples conexiones neuronales y endócrinas, tanto a nivel central como periférico, para regular no sólo las señales de hambre y saciedad, sino también el tamaño de la comida y la cantidad de energía ingerida y acumulada [20].

Por otro lado, es ampliamente reconocido que el consumo de comida “chatarra” tiene una base biológica y es estimulado tanto por factores ambientales como por el estado emocional interno del individuo. Se ha demostrado que dichos alimentos, pobres en nutrientes y de elevado contenido energético y palatabilidad, tienen la capacidad de activar el sistema de recompensa cerebral, asociado al placer, de una manera similar al alcohol y a las drogas de abuso, provocando un incremento en la ingesta de los mismos [21]. De este modo, la regulación del apetito y la comprensión de los efectos de recompensa que genera la ingesta de alimentos ricos en energía, grasas y azúcares, constituye un campo de intensa actividad científica. Todo esto permite que la regulación de la ingesta por el cerebro pueda ser vista en función de dos sistemas: homeostático y no homeostático o hedónico. El primero se relaciona principalmente con el control hipotalámico de la ingesta, regulando el balance de energía mediante el aumento de la motivación para comer tras el agotamiento de las reservas energéticas. El control hedónico de la ingesta se produce principalmente a través del sistema de recompensa mesolímbico e involucra el consumo de alimentos teniendo en cuenta su palatabilidad, pudiendo incluso anular la vía homeostática durante los períodos de abundancia relativa de energía [22].

1.2.1 Regulación periférica de la ingesta.

Dentro de los sistemas periféricos que informan de manera relevante al SNC sobre la situación nutricional y metabólica del individuo se encuentran el tracto gastrointestinal y el tejido adiposo [22]. Estos se comunican con el SNC tanto mediante señales nerviosas de distensión gástrica como por medio de la secreción de distintas hormonas y péptidos (llamadas “señales de apetito y saciedad”) [23]. Por otro lado, en las señales provenientes del tejido adiposo participan hormonas secretadas al sistema circulatorio en proporción directa a la cantidad de grasa almacenada, conocidas como “señales de adiposidad” [24]. Las hormonas y péptidos periféricos y las señales sensoriales producidas por el sistema gastrointestinal y el tejido adiposo viajan por vía sanguínea o a través del nervio vago e impactan sobre el SNC, principalmente en el hipotálamo, donde afectan la producción de distintas señales orexígenas y anorexígenas que modulan el apetito y la composición corporal. Entre las hormonas que regulan de forma periférica la ingesta las principales son leptina, insulina y ghrelina.

Las hormonas insulina y leptina se han destacado como “señales de adiposidad” para el control central y a largo plazo del peso corporal. Los cambios en los niveles plasmáticos de leptina y/o de insulina reflejarían cambios en el estado energético y de la adiposidad del individuo, frente a los cuales el SNC responde ajustando la ingesta para restablecer el tamaño de los depósitos grasos.

- **Leptina:** Es un polipéptido de 167 aminoácidos, producido casi exclusivamente por las células del tejido adiposo blanco de manera proporcional al tamaño de los depósitos de tejido adiposo [23]. Cinco isoformas del receptor esta hormona con diferente longitud del extremo C-

terminal han sido descritas en roedores, siendo la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb) la más importante, ya que no sólo es la única completamente capaz de activar la vía de señalización intracelular, sino que ha sido demostrado que ratones db/db deficientes en ObRb presentan obesidad mórbida [25]. El ObRb está ampliamente expresado en distintas regiones cerebrales, encontrándose principalmente en las poblaciones de neuronas hipotalámicas que expresan neuropéptidos reguladores del apetito. La leptina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y unirse a su receptor ObRb en el hipotálamo, donde actúa sobre los circuitos homeostáticos regulando la expresión y liberación de neuropéptidos para disminuir la ingesta y elevar el gasto energético [26]. Este mecanismo se ve alterado en los individuos obesos, lo que resulta en un estado conocido como resistencia central a la leptina [25].

- **Insulina:** Es un polipéptido de 51 aminoácidos, sintetizado y secretado por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. La síntesis y secreción de insulina depende de los niveles de glucosa, aminoácidos y glucagón en sangre, de los sistemas simpático y parasimpático y estados de estrés [27]. Esta hormona participa en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, particularmente en el metabolismo de los glúcidos. Regula la ingesta y el peso corporal a nivel central, ya que luego de atravesar la barrera hematoencefálica se une a su receptor (RIns), estimulando a las neuronas productoras de neuropéptidos anorexígenos e inhibiendo a las neuronas productoras de neuropéptidos orexígenos en el hipotálamo [28].

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 [29]. Además, cabe destacar que estas señales de adiposidad no sólo regulan al sistema homeostático de control de ingesta, sino que se ha observado que dichas señales también influyen sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas y los procesos de recompensa relacionados con la ingesta hedónica [30], como se describirá más adelante en esta tesis.

- **Ghrelina:** Conocida popularmente como “la hormona del hambre”, puede ser descrita más apropiadamente como una señal para la anticipación a la ingesta de alimentos [31]. Es un péptido gastrointestinal de 28 aminoácidos y un importante factor orexígeno. Es producida fundamentalmente en el estómago y ejerce su efecto a nivel del SNC mediante la unión a su receptor (GhSR) de tipo acoplado a proteína G, que se expresa ampliamente en distintas regiones del cerebro, entre las que se encuentran el hipotálamo [32]. Esta hormona tiene un papel importante en la modulación del tamaño y la frecuencia de las comidas, del peso corporal y de los comportamientos de recompensa motivados por los alimentos [31].

1.2.2 Regulación central de la ingesta.

1.2.2.1 Sistema homeostático de control de la ingesta alimentaria.

Los mecanismos básicos que regulan el balance energético residen en el SNC a distintos niveles del encéfalo [33]. El hipotálamo es una pequeña parte del SNC localizada justo debajo del tálamo, a ambos lados del tercer ventrículo, en la parte inferior del encéfalo. Está estructurado, anatómicamente y funcionalmente, en núcleos neuronales bien definidos que se conectan entre sí a través de proyecciones axonales, estableciendo una compleja red. El hipotálamo desempeña un papel central en la homeostasis de energía, ya que forma parte de un sistema en el cual se integra la regulación de la composición corporal con la ingesta y el gasto de energía. Así, una serie de vías neuronales interconectadas en el hipotálamo reciben la información procedente de los depósitos de energía corporal relacionados con el estado metabólico del organismo y modulan la liberación de péptidos que regulan la ingesta alimentaria y el eje hipotálamo-hipofisario [34]. En este sentido, los núcleos arcuato (ARC), paraventricular (PVN), ventromediano (VMN), dorsomediano (DMN) y el área hipotalámica lateral (HL) son las estructuras principales que intervienen en estos circuitos, dado que contienen neuronas que estimulan o inhiben el apetito, que se encuentran interconectadas entre sí (Figura 1). La integración de señales periféricas dentro del cerebro implica la interacción entre el hipotálamo y las estructuras del cerebro posterior incluyendo el núcleo del tracto solitario (NTS), encargado de recoger la información aferente proveniente del nervio vago, que informa sobre el estado nutricional del individuo [20].

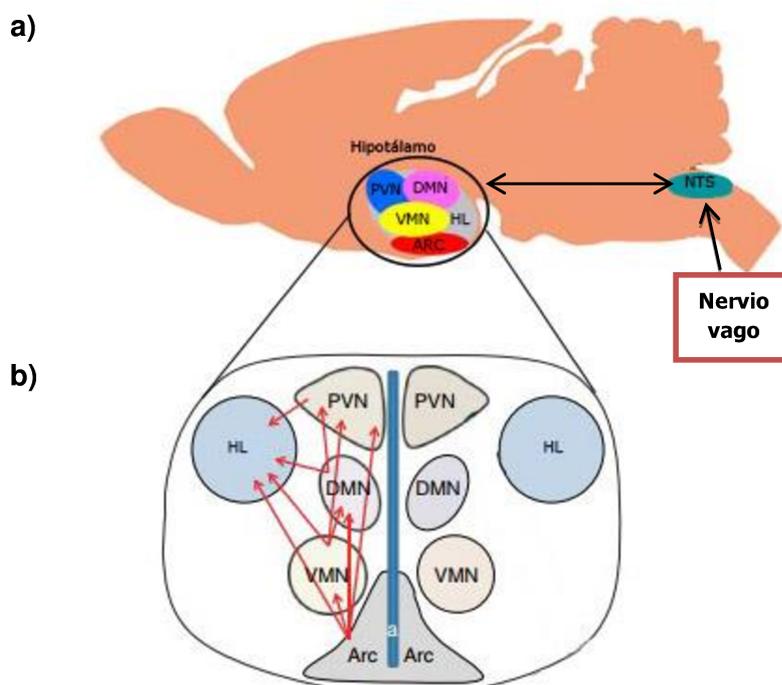


Figura 1. Localización y estructura anatómica del hipotálamo y del núcleo del tracto solitario (NTS). (a) Esquema de un corte sagital del encéfalo de rata en el que se muestra la localización del hipotálamo y la disposición de los diferentes núcleos: Arcuato (ARC), Ventromediano (VMN), Paraventricular (PVN), Dosomediano (DMN) y Área Hipotalámica Lateral (HL). (b) Esquema de un corte coronal del hipotálamo en el que se muestra la disposición relativa de los núcleos y las conexiones neuronales que establecen entre sí (flechas rojas). Adaptado de Roh y col. (2016) [35].

Los primeros estudios que demostraron el rol del hipotálamo en el control de la ingesta y la homeostasis de energía se realizaron mediante lesiones. De esta forma, lesiones en VMN produjeron hiperfagia y obesidad, mientras que aquellas realizadas en el HL resultaron en una disminución de la ingesta energética, al punto tal de provocar la muerte por inanición. Estas observaciones establecieron el concepto de “centro dual” de la ingesta, donde el HL funcionaría como centro del hambre y el VMN como centro de la saciedad [36]. Posteriormente, el descubrimiento de una serie de neuropéptidos y hormonas relacionados con la alimentación y la evidencia de su presencia en neuronas hipotalámicas indicaron que la ingesta de alimentos está controlada por circuitos neuronales altamente complejos. Por lo tanto, el concepto de centros funcionales ha sido reemplazado por un concepto de circuitos neuronales que incluye grupos neuronales orexígenos y anorexígenos interrelacionados [36].

- **Núcleo arcuato.**

El ARC es el principal núcleo hipotalámico implicado en el control de la ingesta. Esto se debe, probablemente, a que está situado en la base ventral del hipotálamo, rodeando al tercer ventrículo (3V) y cerca de la barrera hematoencefálica, ocupando un espacio privilegiado para integrar señales endócrinas y exógenas. Por ello las poblaciones neuronales que residen en este núcleo son altamente accesibles a las hormonas circulantes, como la leptina, insulina y ghrelina [37,38]. El ARC presenta dos poblaciones de neuronas de primer orden que son reguladas directamente por las señales periféricas de adiposidad y de saciedad y que regulan mediante estímulos sinápticos a las neuronas de segundo orden. Una de ellas produce los neuropéptidos anorexígenos Proopiomelanocortina (POMC) y Transcripto Relacionado a las Anfetaminas y Cocaína (CART), mientras que la otra población de neuronas sintetiza los péptidos orexígenos Neuropéptido Y (NPY) y Péptido relacionado al agouti (AgRP) [39]. Todos estos circuitos neuropeptídicos se proyectan a otras áreas hipotalámicas, especialmente a los núcleos PVN, VMN, DMN y HL, donde impactan sobre neuronas de segundo orden que modulan la liberación de otros neuropéptidos involucrados en la regulación del balance energético, controlando así el apetito y la ingesta [34] (Figura 2). En particular, POMC es una pro-hormona, que para actuar es clivada dando lugar a melanocortinas, entre las que se destaca la hormona estimuladora de melanocitos- α (α -MSH), que inhibe la ingesta uniéndose con gran afinidad a receptores de melanocortinas MC3 y MC4 [37]. Las neuronas productoras de POMC se proyectan sobre otras áreas hipotalámicas tales como PVN, donde se libera α -MSH, provocando una respuesta catabólica neta, es decir, una menor ingesta de alimentos, un mayor gasto de energía y pérdida de peso corporal [23]. Además, las neuronas POMC contienen receptores específicos para leptina, insulina y ghrelina. Los receptores de leptina e insulina estimulan la transcripción de los niveles de ARNm de POMC potenciando su acción anorexígena, mediante la activación de canales catiónicos o de potasio sensibles a ATP, respectivamente [40]. Los receptores de ghrelina, en cambio, disminuyen la actividad de estas neuronas, por mecanismos que aún no se encuentran

claros [40]. Por su parte, las neuronas POMC co-expresan CART, produciendo también un efecto de inhibición en la ingesta, sin embargo, ha sido reportado que CART regula la alimentación pero no modifica el gasto de energía, por lo que su acción parece ser exclusivamente inhibidora del apetito [37]. Por otro lado, en ARC, las neuronas productoras de NPY co-expresan AgRP, siendo poderosos factores orexígenos que estimulan la ingesta, que se proyectan principalmente hacia PVN y HL, como así también hacia VMN y DMN [41]. Han sido reportados 5 receptores acoplados a proteína G para NPY (Y1-Y5), sin embargo, Y1 e Y5 son los más importantes involucrados en las señales de apetito, ya que se expresan en los sitios hipotalámicos implicados en la regulación del balance energético, estimulando preferentemente la ingesta de carbohidratos [42]. El efecto orexígeno de esta población neuronal se da también mediante la inhibición de neuronas anorexígenas, dado que AgRP es un antagonista potente y selectivo de los receptores MC3 y MC4 de melanocortinas, y actúa no sólo bloqueando el efecto de α -MSH, sino también inhibiendo de forma robusta y directa a las neuronas POMC [40]. Las neuronas NPY/AgRP poseen receptores para leptina e insulina y son potenciales blancos hipotalámicos para estas hormonas, que al impactar en ellas inhiben tanto la síntesis como la liberación de estos neuropéptidos [41]. Por el contrario, ha sido reportado que la ghrelina, al interactuar con su receptor GhSR, activa a las neuronas NPY/AgRP [40], ya que regula positivamente tanto la expresión de ARNm como la síntesis de estos neuropéptidos, ambos necesarios para mediar las acciones estimuladoras del apetito de la ghrelina [43].

- **Núcleo paraventricular.**

El PVN, situado en la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior, es un centro integrador donde convergen gran cantidad de rutas neuronales involucradas en la homeostasis energética [20]. Esta región recibe una gran cantidad de proyecciones neuronales de NPY/AgRP y POMC/CART provenientes del ARC, que conectan con neuronas de segundo orden. Entre las neuronas de segundo orden se encuentran aquellas que expresan la hormona liberadora de corticotrofina (CRH, por sus siglas en inglés) y la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), que poseen actividad anorexígena [36] (Figura 2). Las neuronas NPY/AgRP inhiben la liberación de CRH. Por otro lado, las neuronas del PVN son moduladas por señales periféricas, ya que poseen receptores para leptina e insulina. La leptina incrementa la expresión y liberación de CRH y, junto con la insulina, inhibe la liberación de NPY en este núcleo.

- **Núcleo Ventromediano.**

El VMN es considerado un núcleo integrador de señales centrales y periféricas, con un papel clave en la regulación de la ingesta y de la homeostasis energética. Las neuronas de este núcleo contienen un gran número de receptores de neuropéptidos y hormonas, tales como leptina, insulina y ghrelina [44]. Las neuronas del VMN están reguladas por el estado nutricional y por las

neuronas POMC del ARC, para disminuir la ingesta [44]. A su vez, las neuronas del VMN envían proyecciones axonales a diferentes núcleos hipotalámicos tales como ARC, PVN, DMN e HL.

- **Hipotálamo Lateral.**

El HL ha recibido gran atención respecto al control de la ingesta. Conocido como el "centro del hambre" del cerebro, se ha caracterizado por ser un centro de integración de señales de diversos *inputs* neuronales que regulan el inicio de la adquisición y consumo de alimentos. Esta área posee dos grupos neuronales productores de neuropéptidos que estimulan la ingesta: las orexinas (OX) A y B (también conocidas como hipocretinas 1 y 2, respectivamente), péptidos muy conservados entre los mamíferos e implicados en múltiples comportamientos que sólo se producen en el hipotálamo; y la hormona concentradora de melanina (MCH), antagonista de las melanocortinas (Figura 2). Estas áreas proyectan ramificaciones hacia PVN, VMN y ARC [45]. Los niveles de ARNm de OX están regulados por las situaciones de ayuno e hipoglucemia, lo que sugiere un papel fisiológico, influenciado por los niveles de glucosa y la presencia de comida en el tracto gastrointestinal. Las OX aumentan la ingesta de alimentos al retrasar el inicio normal de la secuencia de saciedad [41]. Las OX se unen a dos receptores específicos, ampliamente distribuidos en el SNC, que pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteína G: HCRTR1, asociado a la regulación de la ingesta y la recompensa; y HCRTR2, vinculado a la regulación de la excitación y la vigilia [45]. Ambos subtipos de receptores pueden unirse a OX-A y OX-B, pero con diferente afinidad: HCRTR1 tiene una gran afinidad por OX-A, mientras que HCRTR2 tiene igual afinidad por ambas OX [46]. Estas neuronas reciben proyecciones de las neuronas NPY/AgRP del ARC, aparentando ser los *targets* finales de la estimulación de la ingesta por estas neuronas. Por otro lado, las neuronas POMC del ARC bloquean la acción de las neuronas MCH por unión competitiva a los receptores de melanocortinas, disminuyendo la ingesta, acción antagonizada por las proyecciones de AgRP [36]. El 50% de las neuronas productoras de OX expresan receptores para leptina e insulina, por lo que estas hormonas también modulan su actividad. Por último, ha sido reportado que las neuronas productoras de OX y MCH están implicadas en computar las propiedades hedónicas de los alimentos, sirviendo como nodo de convergencia entre los sistemas homeostático y hedónico de control de ingesta [47]. Además, las neuronas OX del HL se activan frente a alimentos de alta palatabilidad, debido a que poseen la capacidad de responder a señales ambientales externas relacionadas con los aspectos cognitivos de la alimentación, anticipándose a las mismas. De este modo, las OX también se encuentran íntimamente relacionadas con el sistema de recompensa cerebral [48].

Por último, algunos trabajos han sugerido que los núcleos PVN y VMN también expresan los neuropéptidos POMC/CART y AgRP/NPY, aunque en menor medida que en ARC [49-51], por lo que su estudio para la comprensión del control de la ingesta resulta sumamente interesante.

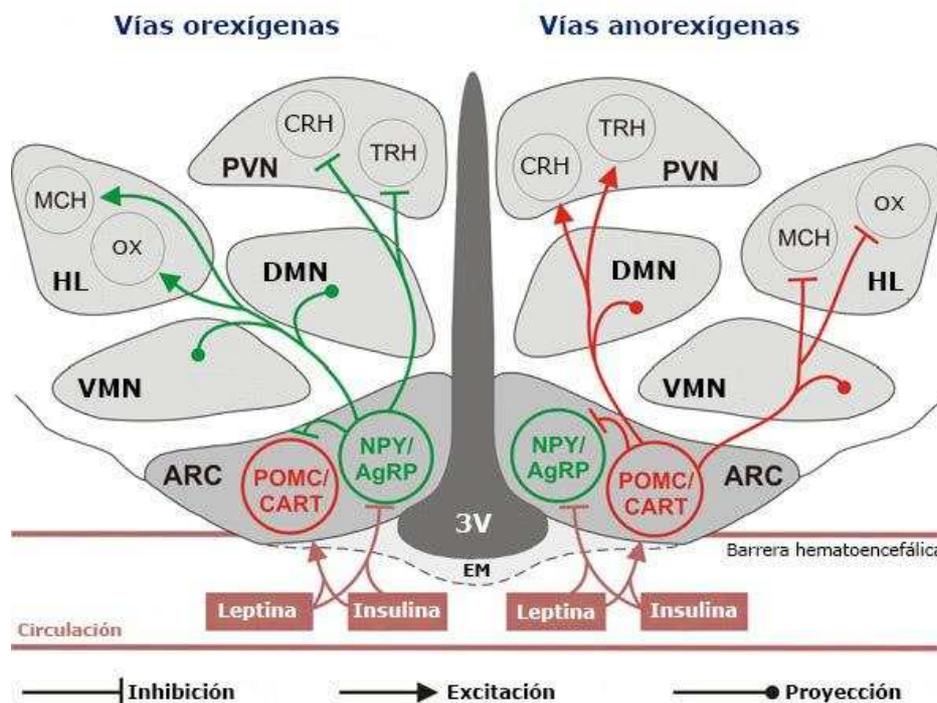


Figura 2. Esquema del hipotálamo que ilustra las vías neurales que estimulan el apetito y reducen el gasto de energía (vías orexígenas, verde) o que suprimen el apetito y aumentan el gasto de energía (vías anorexígenas, rojo). Las hormonas leptina, insulina y ghrelina acceden al cerebro desde la circulación. La leptina y la insulina estimulan las neuronas de primer orden que co-expresan proopiomelanocortina (POMC) / transcripto relacionado a las anfetaminas y cocaína (CART) (de color rojo) e inhiben a las neuronas que co-expresan neuropéptido Y (NPY) / péptido relacionado al aguti (AgRP) (de color verde) dentro del núcleo arcuato (ARC). Se propone que estas neuronas transmitan estas señales a los núcleo paraventricular (PVN), ventromediano (VMN) y dorsomediano (DMN) y al área hipotalámica lateral (HL) del hipotálamo, donde activan neuronas de segundo orden. OX: Orexinas, MCH: Hormona concentradora de melanina, CRH: Hormona liberadora de corticotrofina, TRH: Hormona liberadora de tirotrófina, 3V: tercer ventrículo. Tomado y adaptado de Prior y col. (2011) [52].

1.2.2.2 Sistema de recompensa y su rol en el control de la ingesta.

Dentro del sistema de recompensa se han diferenciado complejas vías de señalización que involucran a diversas moléculas y regiones del cerebro. Un componente central de este sistema es la vía mesolímbica, la cual comienza en el Área Tegmental Ventral (ATV) del mesencéfalo, que es un integrador de información periférica, hipotalámica, límbica, mesencefálica y cortical [53] (Figura 3). El ATV presenta al menos dos poblaciones neuronales entre las que se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas productoras de dopamina (DA) y las interneuronas productoras de ácido gamma-aminobutírico (GABA) [15]. Las neuronas dopaminérgicas del ATV se proyectan hacia el Núcleo Accumbens (NAc), su principal blanco, donde la DA ejerce su acción [54]. Dentro de este núcleo, existen dos subregiones denominadas corteza o *shell* (NAcSh) y núcleo o *core* (NAcC). Se ha reportado ampliamente que NAcSh participa en la regulación de la ingesta, dado que es activado por contextos asociados con la disponibilidad de comida palatable, sin embargo, la función del NAcC en la ingesta aún resulta poco clara [55]. Además, ambos núcleos presentan algunas diferencias en la respuesta hacia la DA. Mientras que la señalización en NAcSh depende del valor hedónico y de la novedad del estímulo, en NAcC dicha liberación es independiente de la valoración positiva o negativa del mismo. De este modo, la activación del

NAcSh depende de las propiedades específicas del estímulo y lleva a una regulación adaptativa luego de una sola pre-exposición al mismo sabor o alimento, sin afectar su valor hedónico [56,57]. El estudio de la arquitectura neuronal del NAc ha revelado la existencia de al menos tres poblaciones, como se muestra en la Figura 4b. Se han reportado dos poblaciones de neuronas GABAérgicas, cada una de las cuales expresa Receptores de DA 1 o 2 (DRD1 y DRD2, respectivamente), y una tercera población de interneuronas colinérgicas que expresan ambos tipos de receptores [58]. En conjunto, no sólo regulan la liberación de DA en NAc, sino que también participan en dos vías de regulación del sistema mesolímbico. La vía “directa”, donde principalmente participan las neuronas DRD1, envía proyecciones al ATV influyendo sobre la actividad tónica GABAérgica; y la vía “indirecta” que se proyecta hacia el HL y el Ventral Pallidum (VP) donde participan las neuronas DRD2 [59,58]. Si bien esta clasificación resulta un tanto dicotómica, no excluye la participación de ambos tipos neuronales en las dos vías de regulación [59,60]. De este modo, NAc no sólo recibe las proyecciones dopaminérgicas, sino que participa de un *feedback negativo* regulando la liberación de DA del ATV, circuito des-inhibitorio que se ve alterado en algunas adicciones a drogas [61].

La DA es el principal neurotransmisor involucrado en la motivación por la comida. Si bien la DA no regula la sensación placentera por la comida *per se*, resulta fundamental en conductas que requieran esfuerzo para obtener la comida deseada, así como para la detección de la recompensa de un nuevo estímulo y la asociación con señales predictivas [21,62]. Los alimentos de alta palatabilidad inducen aumentos agudos de DA en el sistema mesolímbico de recompensa [63]. La señalización a través de la DA ha demostrado ser discretamente enviada otras regiones del cerebro - entre las que se encuentran la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo - para promover la plasticidad dentro de circuitos definidos vinculados al aprendizaje, la motivación y la acción [64], tal como se muestra en la Figura 3. La DA producida por las neuronas dopaminérgicas a través de la acción de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) es luego liberada en las terminales neuronales *target*, donde se expresan los correspondientes receptores acoplados a proteína G. Si bien se han reportado cinco receptores de DA diferentes, mediando la ingesta solo se ha observado la expresión de DRD1 y DRD2 [65,66]. La terminación de la señalización de DA se produce a través de la recaptación activa de la DA remanente por el Transportador Activo de DA (DAT) [67]. A su vez, la señalización dopaminérgica se halla bajo el control de las interneuronas GABAérgicas presentes en ATV (Figura 4a). Habitualmente estas neuronas se encuentran inhibiendo la liberación de DA, dado que el GABA es el principal neurotransmisor con acción inhibitoria en el cerebro generado a través de la enzima glutamato decarboxilasa (GAD). Dicha enzima presenta dos isoformas con diferente localización celular y tamaño: GAD1 (67 KDa) ubicada principalmente en el citoplasma y GAD2 (65 KDa) localizada cerca de las terminales neuronales [68]. Estudios recientes han demostrado que las neuronas GABAérgicas del ATV serían las predictoras del valor de recompensa que se le asigna a cada estímulo, siendo las

dopaminérgicas las que envían la señal de motivación al resto del circuito [69]. El estudio de la arquitectura neuronal del NAc ha revelado la existencia de al menos tres poblaciones que, en conjunto, regulan la liberación de DA en NAc (Figura 3b). Se han reportado dos poblaciones de neuronas GABAérgicas, cada una de las cuales expresa DRD1 o DRD2, y una tercera población de interneuronas colinérgicas que expresan ambos tipos de receptores [58]. Por otra parte, la señalización de DA promueve la liberación de opioides endógenos, los cuales bloquean la liberación de GABA por las interneuronas presentes en ATV [15]. Los opioides, generados principalmente por el hipotálamo, NAc y VP, se unen directamente a sus receptores - entre los cuales el más importante es el Receptor Mu (μ), también conocido como MOR - para potenciar la señalización de recompensa en las diferentes regiones del sistema mesolímbico. La activación de los receptores MOR induce específicamente la ingesta de alimentos grasos [70]. Se ha visto que tanto las acciones directas como indirectas de los opioides, junto con la activación de las neuronas dopaminérgicas, crean una sensación placentera asociada con el consumo de alimentos de sabor agradable, lo cual se considera responsable de impulsar la excesiva ingesta de alimentos de alta palatabilidad, ricos en grasas y con alto contenido de azúcar en comparación con los alimentos que no son agradables al paladar [15].

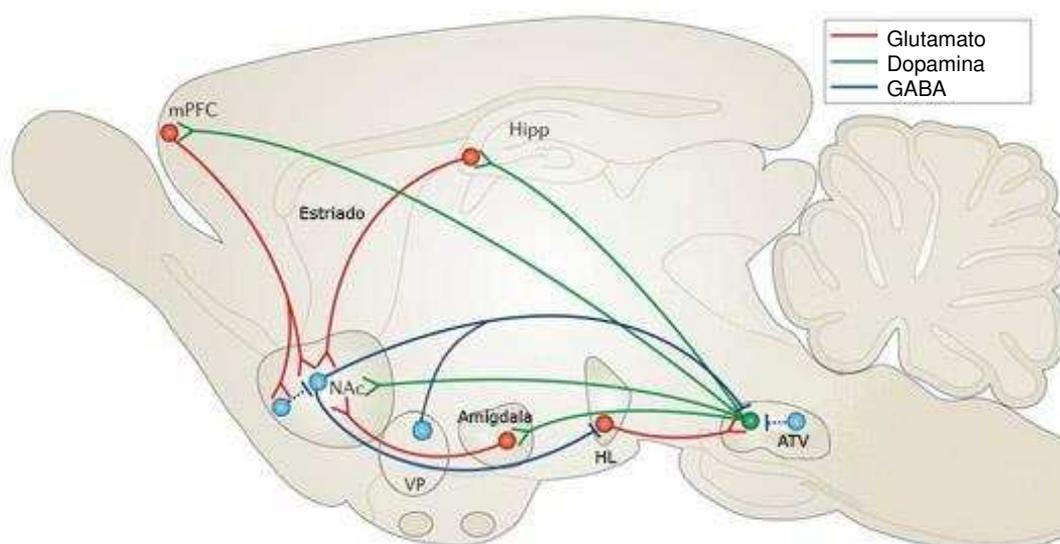


Figura 3. Detalle de las principales vías del sistema de recompensa. Se destacan en verde las proyecciones dopaminérgicas, en rojo las proyecciones glutamatérgicas, y en azul los inputs GABAérgicos hacia las diferentes regiones: Área Tegmental Ventral (ATV), Núcleo Accumbens (NAc), Ventral Pallidum (VP), Amígdala, Hipotálamo Lateral (HL), Hipocampo (Hipp) y Corteza Media Prefrontal (mPFC). Tomado y adaptado de Russo y Nestler (2013) [71].

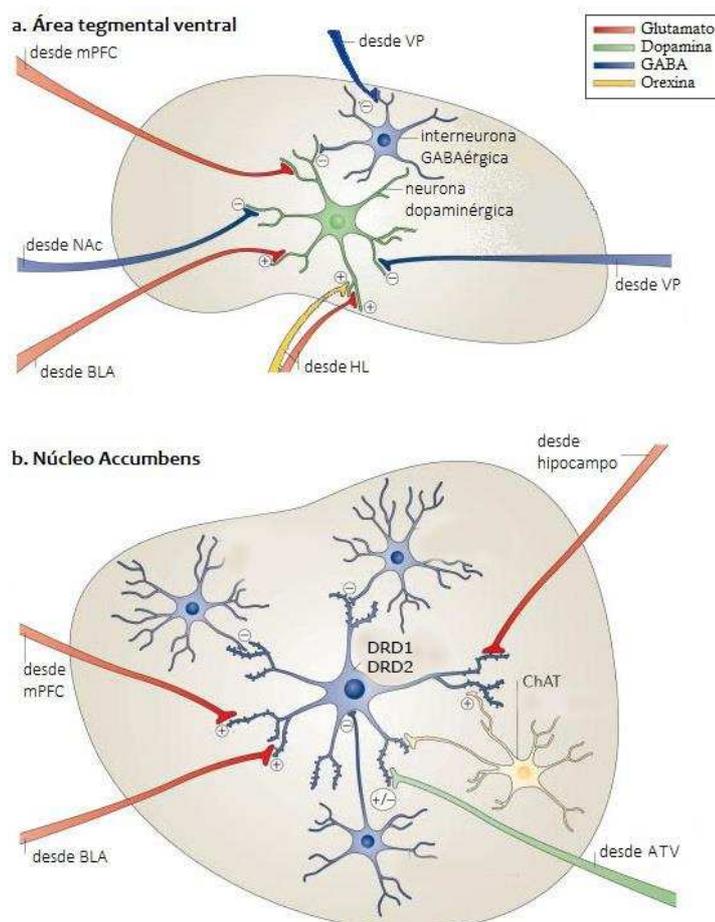


Figura 4. Esquema de las poblaciones neuronales del área tegmental ventral (ATV) y del Núcleo Accumbens (NAc) y sus *inputs* principales. (a) Detalle de las neuronas dopaminérgicas y de las interneuronas GABAérgicas del ATV. Se destacan las proyecciones glutamatérgicas excitatorias de amígdala baso-lateral (BLA), área hipotálamica lateral (HL) y corteza media prefrontal (mPFC), así como los *inputs* orexinérgicos del HL sobre las neuronas dopaminérgicas. Se muestra también la proyección inhibitoria de las neuronas GABAérgicas sobre las dopaminérgicas, así como los *inputs* GABAérgicos provenientes del NAc y del Ventral Pallidum (VP). (b) Detalle de las neuronas DRD1 y DRD2 del NAc y de las interneuronas colinérgicas (ChAT). Se destacan las proyecciones dopaminérgicas del ATV, y glutamatérgicas de BLA, mPFC e hipocampo. Código de colores: verde=dopamina; rojo=glutamato; azul=GABA; amarillo=orexinas. Tomado y adaptado de Russo y Nestler (2013) [71].

Por otro lado, la amígdala, una estructura muy conservada entre las diferentes especies, es otra región que recibe entradas de las neuronas dopaminérgicas del ATV [72]. Es un núcleo clave en el procesamiento de las emociones y el condicionamiento asociativo de respuestas relacionadas con los alimentos, dado que recibe información sensorial a partir de la zona posterior del cerebro y la corteza, además de las señales fisiológicas internas relacionadas con el hambre y la saciedad [55]. Si bien se han logrado diferenciar dos subregiones con características específicas, su rol en la regulación del comportamiento hacia los alimentos aún permanece poco claro. La Amígdala Baso-lateral (BLA), que consiste principalmente en neuronas glutamatérgicas, recibe información sensorial de los estímulos externos y se proyecta hacia NAc donde modula el flujo de DA, participando en conductas donde se ve modificado el valor de recompensa de un estímulo (devaluación hedónica). El núcleo Central de la Amígdala (CeA), formado por neuronas GABAérgicas, recibe entradas de BLA y participa en la codificación de recompensas positivas,

dado que envía proyecciones a las neuronas no-dopaminérgicas en las proximidades del ATV [73,72,74]. Así, a través de la interacción con otras regiones como el HL o NAc, se ha observado que las dos subregiones de la amígdala conectan la información sensorial externa e interna con los sistemas de motivación del cerebro para guiar los comportamientos motivados [74]. Más aún, se ha observado que tendría un papel importante en el consumo de los alimentos palatables mediado por los opioides, dado que la inactivación de BLA evita completamente el aumento de la ingesta de grasas inducido por opioides [75] y la señalización opioide en CeA permite determinar qué estímulo tiene mayor valor de motivación [76].

Como ya se ha comentado, las neuronas orexinérgicas del HL actúan como nexo entre los sistemas homeostático y hedónico. Éstas envían principalmente proyecciones hacia el ATV, favoreciendo su activación y participando en las conductas motivadas que requieren grandes esfuerzos [77]. Además, el HL a través de las OX, la MCH, o mediante la acción inhibitoria del GABA modula de manera directa la actividad del NAc [78]. Por su parte, NAc envía proyecciones GABAérgicas hacia el HL, que permiten desinhibir a las neuronas productoras de OX [79]. Se ha visto que lesiones en NAcSh aumentan la ingesta de alimentos, mientras que su estimulación la disminuye, por lo cual la regulación de su respuesta resulta de gran interés en los comportamientos motivados [55]. De este modo, mediante la señalización de OX y de los opioides que se liberan en paralelo con la señalización GABAérgica de estos núcleos, se podría aumentar la percepción hedónica de los alimentos y promover así la ingesta [78]. Por otro lado, el HL regula indirectamente la actividad del NAcSh a través de ciertas regiones que actúan como "relé", entre las cuales se destaca el VP. Se ha propuesto que NAcSh, junto con HL y VP integran un circuito lateral de control, dado las interacciones existentes entre estos núcleos [80]. El VP recibe una entrada de OX desde el HL que incrementa el gusto por los alimentos, y así puede ejercer una acción inhibitoria sobre NAcSh a través de proyecciones GABAérgicas [78], lo que incrementa el comportamiento motivado hacia el alimento. De este modo, VP y HL tienen una función reguladora importante sobre la inactivación del NAcSh para promover la ingesta en condiciones de saciedad [80].

Todos estos sistemas descritos, a su vez, están regulados por la leptina, insulina y ghrelina, como se muestra en la Figura 5. En primer lugar, la expresión del receptor ObRb en las neuronas del mesencéfalo sugiere un potencial rol de la leptina, al transmitir las señales metabólicas periféricas directamente a los circuitos cerebrales mesolímbicos que regulan la motivación de la ingesta [81]. Se ha observado también que la ingesta crónica de una dieta con elevado contenido graso induce una resistencia celular a la leptina en ATV [82], así como una disminución en la activación de las neuronas dopaminérgicas en respuesta a la sacarosa [83]. De este modo, la leptina podría modular el valor hedónico de los alimentos a través de la inactivación de las neuronas del ATV. Por su parte, la señalización de insulina en las neuronas dopaminérgicas ha demostrado que disminuye la sensación de recompensa asociada a la comida sin afectar la

motivación para ingerir alimentos [84]. Sin embargo aún se desconoce si dicha señalización a través de su receptor en ATV participa en la regulación de la homeostasis de la glucosa [85]. Por último, se ha demostrado que la administración central o periférica de ghrelina aumenta la concentración de DA en NAc [86]. El ATV también es sensible a la acción de la ghrelina, y se ha visto que requiere de la señalización de los opioides en los comportamientos motivados [87]. Se demostró que existe un alto grado de coexpresión de TH y GhSR en ATV en adultos [88,89]. Se conoce que la ghrelina induce la liberación de DA en ATV, estimulando la ingesta de alimentos [55], por lo tanto, la coexistencia GhSR-TH sugiere una posible regulación coordinada de los niveles de DA. Asimismo interacciones con otros sistemas, como las orexinas, han sido reportadas [90], sugiriendo entonces que podría actuar como un intermediario entre los estados fisiológicos y los circuitos motivacionales para promover los comportamientos hacia el alimento [91].

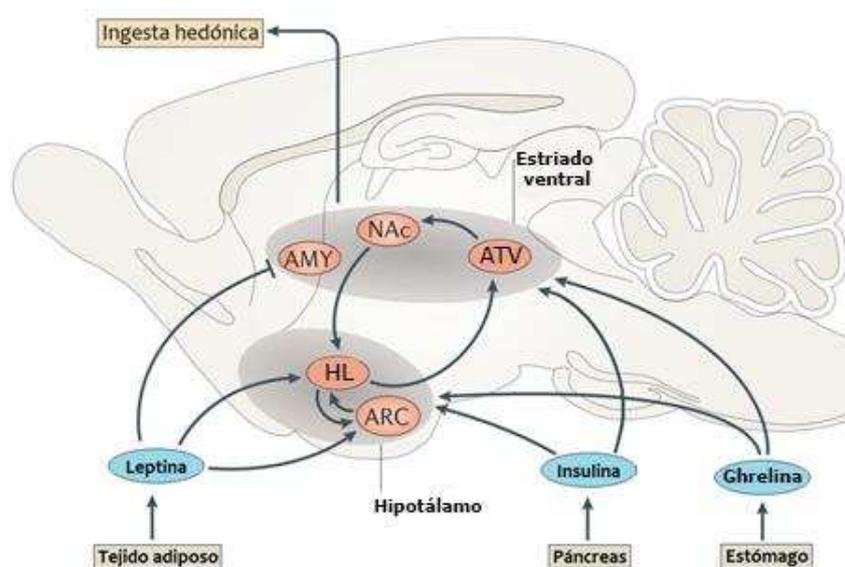


Figura 5. Participación de la señalización hormonal en la regulación de la ingesta. Ghrelina, insulina y leptina modulan la percepción hedónica de la comida y la motivación por la misma a través de su impacto en los diferentes núcleos del sistema de recompensa. También actúan sobre el hipotálamo, participando en la regulación homeostática de la ingesta. Las neuronas dopaminérgicas en el Área Tegmental Ventral (ATV) se proyectan principalmente al Núcleo Accumbens (NAc) para resaltar el valor de recompensa de la comida palatable. Las neuronas del área del área hipotalámica lateral (HL) integran la información vinculada a la regulación hedónica proveniente del NAc y homeostática del núcleo arcuato (ARC) influyendo en la percepción de la saciedad. AMY: amígdala. Tomado y adaptado de Morton y col. (2014)[92].

- **Mecanismos hedónicos y conducta alimentaria.**

La señalización del sistema de recompensa desempeña un papel crucial en los comportamientos motivados, siendo la DA una señal importante en el valor del incentivo representado por los alimentos y, por lo tanto, actuando como un determinante en el patrón de comportamientos observados en la saciedad sensorial específica [73,93]. El término “saciedad sensorial específica” se refiere a un fenómeno hedónico sensorial relacionado a la disminución en la satisfacción generada por el consumo de cierto tipo de alimentos, y la consecuente renovación en el apetito que resulta de la exposición a un nuevo sabor o alimento [94]. Numerosos estudios

realizados en humanos y animales demostraron que la saciedad sensorial específica es uno de los mecanismos por los cuales una dieta que contiene una mayor variedad de alimentos aumenta la ingesta, en comparación con una dieta que no presenta variedad [93,95,96]. Esto se ha vinculado a la prevalencia creciente de la obesidad, donde la amplia disponibilidad de los alimentos hipercalóricos y ricos en grasas estimula constantemente el desarrollo de este tipo de conductas [97].

Dadas las alteraciones reportadas en el sistema mesolímbico en distintos modelos de obesidad, se han desarrollado diferentes tests conductuales para evaluar las posibles modificaciones en el comportamiento hacia los alimentos. Si bien los mecanismos vinculados a la saciedad precisan de una profunda investigación, algunos autores han propuesto que las proyecciones de la amígdala hacia NAc podrían transmitir información sobre estímulos gustativos específicos y la pérdida de su valor de recompensa a causa de la saciedad [93]. La participación de esta región en el procesamiento de las emociones, el aprendizaje y el desarrollo de comportamientos motivados, así como su interacción con el HL, refuerzan esta idea. Por lo tanto, la ingesta de una gran variedad de alimentos de alta palatabilidad podría afectar la saciedad sensorial específica como una manifestación de la alteración en el funcionamiento del sistema dopaminérgico.

- ***Mecanismos hedónicos y conducta social.***

De manera similar a los niños, la mayoría de los mamíferos jóvenes pasan una parte importante de su etapa madurativa participando en juegos con sus compañeros, tales como correr, perseguir, escalar y pelear. La capacidad de participar en juegos sociales es uno de los principales indicadores del desarrollo saludable, tanto en animales como en humanos [98]. Así, el juego social, al igual que otros comportamientos como la alimentación y el comportamiento sexual, activa al sistema de recompensa cerebral de manera natural y es importante para el desarrollo y la supervivencia tanto en ratas como en primates no humanos [99]. La investigación sobre los fundamentos neurobiológicos de la conducta de juego social ha proporcionado una gran cantidad de evidencia de que está modulada por los sistemas neuronales que también median las propiedades subjetivas y motivacionales positivas de los alimentos, el sexo y las drogas de abuso [98]. De esta manera, se ha demostrado en las últimas décadas que los sistemas de neurotransmisores involucrados en la recompensa hacia los alimentos y las drogas también modulan las propiedades subjetivas positivas del juego social. Por lo tanto, realizar diferentes test conductuales tales como el test de interacción social nos brindaría información acerca del estado de estos sistemas cerebrales en los animales.

1.3 NEUROESTEROIDES.

Las hormonas esteroides son sintetizadas *de novo* a partir de colesterol en las gónadas, glándulas adrenales y placenta. Las mismas no sólo ejercen su acción sobre los órganos reproductores, sino que, además, pueden atravesar la barrera hematoencefálica y actuar sobre el sistema nervioso central y periférico. En este sentido, el sistema endocrino está estrechamente ligado al cerebro y presenta una fuerte influencia sobre sus funciones [100]. Numerosos estudios han demostrado que distintas regiones del cerebro de roedores y del hombre, entre las que se incluye el hipotálamo, son capaces de sintetizar una variedad de esteroides *de novo*, denominados neuroesteroides [100]. Poseen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras y regulan distintos procesos asociados al desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (apoptosis, sinaptogénesis y proliferación celular), la regulación de los sistemas de neurotransmisores, la neurogénesis, la arborización de las dendritas, la mielinización y las funciones de memoria y aprendizaje [101,102]. El concepto de neuroesteroidogénesis ha sido sustanciado, tanto en neuronas como en células de la glía, por la expresión de los genes que codifican las enzimas esteroidogénicas, por la medición de las correspondientes actividades enzimáticas y por la determinación directa de los neuroesteroides [103].

1.3.1 Vías de síntesis de los neuroesteroides: principales enzimas y proteínas implicadas.

Se ha demostrado, por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, la expresión de las enzimas que intervienen en la síntesis de esteroides en diversas áreas del cerebro. Las enzimas esteroidogénicas pueden diferenciarse en dos grandes grupos de proteínas nombradas como citocromos P450 o hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD). Dentro de las principales proteínas/enzimas esteroidogénicas, encontramos la proteína de la regulación esteroidogénica aguda (StAR; del inglés *Steroidogenic Acute Regulatory protein*), citocromo P450_{scc} (P450_{scc}, del inglés *P450 cholesterol side-chain cleavage*), 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa / Δ 5- Δ 4 isomerasa (3 β -HSD), esteroide 5 α -reductasa 1 (5 α -R), 3 α -hidroxisteroide deshidrogenasa (3 α -HSD), P450 aromatasa (ARO) y 17 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD-3). La actividad biológica de las enzimas mencionadas ha sido reportada por la habilidad de los explantes de cerebro de convertir precursores radiomarcados en neuroesteroides bioactivos [103]. La mayoría de estas enzimas están implicadas en la síntesis *de novo* de los esteroides en el cerebro. Contrariamente, otras enzimas como la ARO y la 5 α -R son principalmente responsables de la conversión que sufren las hormonas esteroides producidos por las gónadas que atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro [103]. La Figura 6 ilustra las vías de síntesis de neuroesteroides en el cerebro.

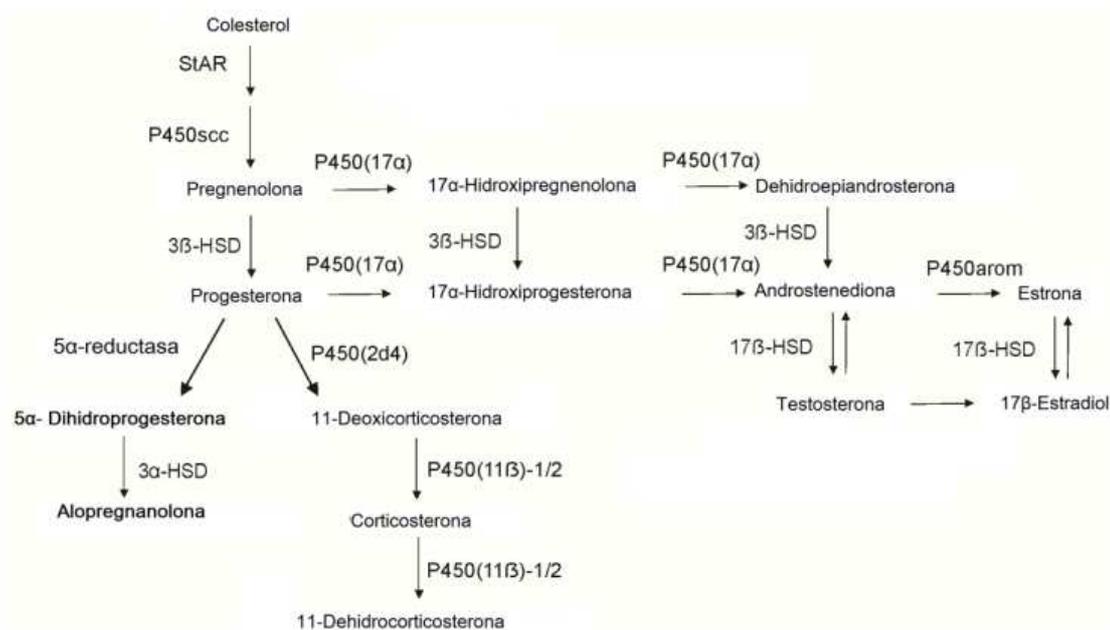


Figura 6. Rutas bioquímicas para la síntesis de neuroesteroides en el cerebro de vertebrados. StAR, Proteína de la regulación esteroidogénica aguda; p450scc, citocromo P450 side-chain cleavage; 3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5 α -reductasa, esteroide 5 α -reductasa 1; 3 α -HSD, 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450(17 α), citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa; P450arom, citocromo P450 aromatasa; P450(11 β)-2, aldosterona sintasa; 17 β -HSD, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Tomado y adaptado de Rossetti y col. (2015) [104].

El acceso del colesterol a la primera enzima neuroesteroidogénica, la citocromo P450scc constituye la etapa limitante de la síntesis de esteroides. La P450scc está localizada en el interior de la membrana mitocondrial y requiere de una proteína que transporte el colesterol al interior de dicha membrana [105]. Esta función es llevada a cabo por StAR (Figura 7). Furukawa y col. [106] demostraron por primera vez la presencia de ARNm de StAR en el cerebro de rata y sus resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica en cerebro humano, de rata y de ratón [107]. StAR está ampliamente distribuida en el cerebro, aunque su expresión está limitada a poblaciones celulares específicas incluyendo neuronas, células gliales y precursores en proliferación en corteza, hipocampo, hipotálamo, entre otros [107].

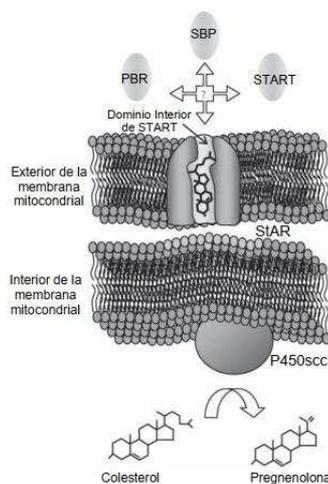


Figura 7. Representación de la proteína esteroidogénica de regulación aguda (StAR) y la citocromo P450scc (P450scc) en la mitocondria. StAR se encuentra localizada en la parte exterior de la membrana

mitocondrial donde el esteroide precursor (colesterol) esta acumulado. StAR tiene un dominio interior que facilita el transporte del colesterol hasta P450scc, la cual se encuentra localizada en el interior de la membrana mitocondrial. Otras proteínas (denominadas PBR, SBP o START) podrían interactuar con StAR para colaborar con el transporte. El colesterol es convertido a pregnenolona por la enzima P450scc. Tomado y adaptado de Sierra (2004) [107].

La enzima P450scc es una monooxigenasa mitocondrial y cataliza el primer paso de la vía de síntesis de neuroesteroides: la conversión de colesterol en pregnenolona. Dicha reacción ocurre en tres etapas sucesivas: 20 α -hidroxilación; 22-hidroxilación y la escisión del C20-C22 de los enlaces de carbono de la molécula de colesterol [103]. La presencia de P450scc se describió tanto en células neuronales como células gliales. En embriones de ratas, los sitios de mayor expresión de la P450scc se encontraron principalmente en estructuras sensoriales del sistema nervioso periférico, sugiriendo una posible función de dicha enzima en el desarrollo y la maduración del cerebro [108]. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa luego de una transcripción reversa (RT-PCR) y *Southern blot*, se reportó que la expresión de P450scc también es región-específica en el cerebro adulto, encontrándose niveles similares en todo el cerebro [103]. Aunque es posible detectar ARNm de P450scc en cerebro, los niveles de expresión resultan extremadamente menores comparados con los niveles en testículo u ovario [103]. El hecho de que su expresión sea tan baja dificulta su estudio en cerebro, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

Por su parte, la enzima 3 β -HSD es una deshidrogenasa / isomerasa y actúa convirtiendo la pregnenolona en progesterona; aunque también interviene en otras reacciones esteroideogénicas [109]. Existen al menos dos isoformas humanas y cuatro en roedores [103]. En rata, la isoforma tipo 1 ha sido reportada en distintas regiones del cerebro como cerebelo, hipocampo, corteza e hipotálamo, aunque los niveles de expresión resultan bajos comparados con los niveles hallados en testículos y ovarios [101]. Además, su expresión ha sido reportada junto con la del receptor de progesterona (RP), sugiriendo una acción parácrina de la progesterona sintetizada en forma local [110]. En la corteza cerebelar, el ARNm ha sido detectado en células de Purkinje, granulares y basket/estelares; contrariamente, en otras áreas del cerebro, 3 β -HSD sólo se pudo determinar en células neuronales [103].

La pregnenolona también puede ser convertida a 17 α -hidroxipregnenolona por la enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa (P450(17 α)). Dicha enzima tiene actividad hidroxilasa/liasa y también interviene en la formación de los andrógenos androstenediona y dehidroepiandrosterona (DHEA) [101].

La importancia fisiológica de la 5 α -R en el cerebro deriva de dos de sus propiedades: su capacidad de convertir testosterona en uno de sus andrógenos más potentes, la dihidrotestosterona (la cual participa en procesos de diferenciación sexual en algunas regiones del cerebro) y la capacidad de convertir progesterona y desoxicorticosterona en sus derivados reducidos, precursores de alopregnanolona y tetrahidrodesoxicorticosterona [103]. Dos isoformas de la 5 α -R

han sido reportadas: 5α -R tipo 1 y tipo 2. La 5α -R tipo 1 es la isoforma predominante en cerebro de rata, ratón y humanos y ha sido descrita como una enzima constitutiva que juega un rol protector en procesos neuronales y catabólicos. Dicha isoforma ha sido reportada en hipotálamo, amígdala, hipocampo, cerebelo y corteza cerebral, entre otras regiones [103], dado que es la que se estudiará en este trabajo de tesis, se hará referencia a la misma como 5α -R. La 5α -R tipo 2, en cambio, ha sido asociada a funciones dimórficas sexuales en el macho como el desarrollo de la próstata y los órganos genitales externos y la diferenciación del sistema nervioso central. Esta isoforma se encuentra en cerebro de rata, casi exclusivamente durante el desarrollo fetal tardío y los estadios post-natales tempranos [103].

La enzima 3α -HSD es una enzima bifuncional que convierte, de manera reversible, esteroides 5α -reducidos en tetrahidrosteroides [103]. Entre las reacciones en las cuales participa, la conversión de 5α -dihidroprogesterona a alopregnanolona es una de las más destacadas, considerando la gran importancia que ha adquirido en los últimos años la alopregnanolona a nivel de las funciones cerebrales. Una única isoforma fue detectada en rata, que interviene en todas las reacciones oxidativas y reductivas [111] y ha sido descrita en numerosas regiones del cerebro en forma de ARNm y proteína, tanto en células neuronales y gliales. Los máximos niveles fueron reportados en el bulbo olfatorio; mientras que las mínimas concentraciones fueron encontradas en corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, entre otros [109].

La enzima ARO es un complejo enzimático terminal que cataliza la conversión de los C19 andrógenos a C18 estrógenos: estrona y estradiol (E_2) [109]. En muchas especies, incluidos humano, rata y ratón, el gen que codifica para dicha enzima es único [103]. La presencia de ARNm de ARO fue detectada en el cerebro de mamíferos utilizando RT-PCR e hibridación *in situ*. En rata, la expresión de dicha enzima fue descrita en el área preóptica, hipotálamo, amígdala media e hipocampo, entre otras regiones. La presencia de la proteína fue confirmada por inmunohistoquímica en la corteza cerebral, el sistema límbico y el hipotálamo [103].

La conversión de los 17-cetoesteroides y los 17β -hidroxiesteroides es catalizada por una enzima multifuncional y reversible denominada 17β -HSD, que es responsable de la biosíntesis y la inactivación de las hormonas esteroides sexuales [112]. Ésta enzima también cataliza la conversión reversible de otros esteroides C19 como la DHEA y el androstenediol [112].

Por último, la enzima aldosterona sintasa (P450(11 β)-2) es una enzima esteroide 11- β -monooxigenasa que cataliza los pasos de síntesis de aldosterona, corticosterona y 18-hidroxicorticosterona [103].

1.3.2 Neuroesteroides y su rol en el control de la ingesta.

Ha sido reportada una relación cercana entre los esteroides y la ingesta energética. La administración crónica de progesterona a través de parches subcutáneos o inyecciones intraperitoneales incrementa la ingesta energética y el peso corporal en ratas hembras adultas [113,114]. Por otro lado, se ha reportado que la alopregnanolona incrementa la ingesta energética, particularmente de alimentos hipercalóricos, y la ganancia de peso corporal al ser administrada en forma intraperitoneal en ratas [115-117]. Además, mujeres obesas o con trastornos de alimentación compulsiva presentan niveles circulantes de alopregnanolona incrementados [118,116]. Los estrógenos y sus receptores desempeñan un papel fundamental en el control de la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa, ya que regulan la ingesta, peso corporal, gasto de energía, sensibilidad a la insulina y a la leptina y la distribución de grasa corporal [119]. Los efectos del E₂ sobre el balance de energía se han conocido durante mucho tiempo y están mediados principalmente por el receptor de estrógenos alfa (RE α) a nivel central. RE α se expresa ampliamente en varios núcleos hipotalámicos, como ARC, VMN y PVN. En ARC, el RE α se expresa principalmente en las neuronas POMC, donde se producen la mayoría de las acciones de los estrógenos en la ingesta de alimentos [120]: la mayor señalización de RE α suprime el consumo y aumenta el gasto de energía [121]. Por otro lado, la administración de E₂ en PVN reduce la ingesta energética [122]. Además, ha sido reportado que la señalización estrogénica potencia la sensibilidad a la leptina, probablemente mediante el incremento de la expresión del ObRb en el hipotálamo [119], lo que representaría otro mecanismo mediante el cual el E₂ ejerce su efecto anorexígeno. En vista de estos resultados, podemos esperar que los neuroesteroides sintetizados *de novo* en el cerebro, particularmente en el hipotálamo, tengan un impacto importante sobre el control de la ingesta.

1.4 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.

Los mecanismos que regulan la expresión de las moléculas involucradas en la regulación de la ingesta son variados. Particularmente, la regulación de la expresión génica por mecanismos epigenéticos actualmente ocupa un punto muy importante en la búsqueda de comprender los mecanismos de control génico neuronal. La metilación del ADN es una modificación epigenética importante que controla la expresión génica en estados fisiológicos y patológicos. Así, diferentes trastornos metabólicos, entre los que se incluye la obesidad, se asocian con alteraciones en la expresión génica causadas por factores genéticos y ambientales, que podrían modificar el patrón de metilación del ADN en los tejidos somáticos [123]. De hecho, ha sido reportado que exposiciones a un ambiente calórico alto podrían afectar los patrones epigenéticos del ADN en los centros hipotalámicos de control de la ingesta, resultando en la alteración de la expresión génica y obesidad [124]. Una modificación epigenética de la cromatina involucra cambio de bases y proteínas asociadas en ausencia de cambios en la secuencia de ADN [125]. Algunas de las modificaciones epigenéticas conocidas y muy estudiadas son la acetilación y metilación de las

histonas y la metilación del ADN, siendo la última uno de los mecanismos más estudiados relacionado con el silenciamiento de los genes [126] y un mecanismo mediante el cual la dieta podría modificar la predisposición genética a la enfermedad.

1.4.1 Mecanismos de metilación diferencial del ADN.

La metilación es una modificación química mediada por enzimas que adicionan grupos metilos (-CH₃) en sitios específicos de proteínas, ADN y ARN. La modificación del ADN afecta únicamente a la base citosina (C) cuando esta seguida de una guanosina (G), de manera que la metilación ocurre en sitios CpG (donde “p” se refiere al enlace fosfodiéster que une a C y G) [127]. La frecuencia de secuencias CG repetitivas a lo largo del genoma es muy baja, excepto en regiones específicas (por lo general de un tamaño que oscila entre 200 a 3000 pb) donde la periodicidad de CpG es mayor a la esperada. Estas regiones se denominan islas CpG y están presentes en aproximadamente el 40% de los promotores de los genes conocidos de mamíferos. La mayor o menor metilación de los sitios CpG ubicados en regiones promotoras de un gen está asociado con el nivel de transcripción del gen. Por ejemplo, si los genes presentan altos niveles de transcripción, los sitios CpG en las islas CpG están demetilados [128]. Esta observación conlleva a la hipótesis de que la metilación de los sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión de un gen (silenciarlo). El mecanismo de silenciamiento de genes por metilación se encuentra todavía en discusión, pero se postula que esta modificación provoca una remodelación física de la cromatina, impidiendo el ingreso de diversos factores de transcripción al área afectada. La enzima ADN metiltransferasa adiciona los grupos metilos a sitios CpGs de la región promotora y estos grupos son reconocidos por las proteínas de unión a regiones metil-CpG. Estas últimas se acoplan a los complejos de remodelación de la cromatina que conducen a una configuración cerrada del promotor a través de las modificaciones de las histonas; evitando así que se unan los factores de transcripción requeridos para la activación de la misma (Figura 8) [129]. En este sentido, diversos estudios revelaron que neuropéptidos como POMC y NPY son conocidos *targets* de regulación epigenética, particularmente en el contexto de dietas obesogénicas [130,131]. En este mismo contexto, se ha reportado que modificaciones en la expresión de ARNm se corresponden con cambios en los patrones de metilación del ADN en moléculas de la vía dopaminérgica tales como TH, DAT y DRD1 [132,133]. Los cambios en el estado de metilación de genes implicados en la síntesis de esteroides en el cerebro han sido poco abordados. Sin embargo, poco se conoce sobre las regiones promotoras de estas moléculas en el cerebro, los factores de transcripción implicados o los posibles sitios sensibles a metilación. En este sentido, ha sido reportado por nuestro grupo que el envejecimiento, el ambiente enriquecido y la preñez con y sin lactancia alteran el estado de metilación de algunas enzimas neuroesteroideogénicas tales como 5 α -R y ARO, resultados que se condicen con cambios en la expresión de ARNm de las mismas [134,104]. No obstante, estos estudios fueron realizados en hipocampo y, al momento, no se encontraron resultados en núcleos hipotalámicos discretos, con

excepción de los expuestos en el presente trabajo de tesis. De esta manera, la búsqueda de mecanismos de metilación diferencial que generen la activación/inhibición de las enzimas esteroidogénicas, resulta un foco de estudio sumamente interesante.

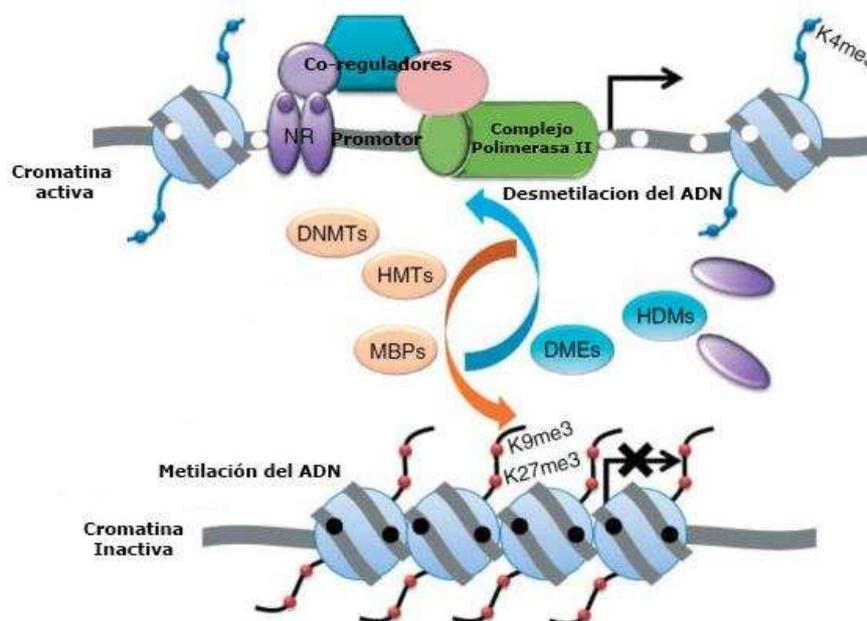


Figura 8. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que regula la expresión génica. El empaquetamiento de los genes en cromatina activa o inactiva determina si estos son accesibles transcripcionalmente o no. La hipermetilación del promotor está asociada con el silenciamiento transcripcional, en parte debido a la pérdida de afinidad por factores de transcripción como el receptor nuclear (NR) y la accesibilidad por la maquinaria transcripcional representada por los complejos de ARN Polimerasa II. La cromatina inactiva aumenta la afinidad por las proteínas de unión al ADN metiladas (MBPs), que reclutan aún más metiltransferasas del ADN (DNMTs) y las metiltransferasas de las histonas (HMTs) entre otros co-represores. En contraste, los promotores no metilados están asociados a la transcripción génica. Tienen una mayor afinidad por las histonas desmetilasas (HDM), las ADN desmetilasas (DME) y las marcas de histonas asociadas con la cromatina activa. La remodelación de nucleosomas, como el reposicionamiento y la activación del promotor da como resultado la transcripción génica (flecha doblada). Me: metilación de histonas (círculo relleno negro), dinucleótidos CpG metilados (Círculo relleno blanco), dinucleótidos CpG no metilados (Círculo púrpura lleno), hormonas o disruptores endocrinos que se unen a NR. Tomado y adaptado de Zhang y col. (2011) [125].

1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE OBESIDAD: DIETA DE CAFETERÍA.

La regulación del apetito puede ser aún más difícil debido a la abundancia y la fácil disponibilidad de la llamada “comida chatarra”, compuesta por alimentos altamente procesados, palatables e hiperenergéticos, que a menudo son deficientes en las vitaminas y nutrientes esenciales que se encuentran en los alimentos no procesados [10]. Actualmente, es ampliamente reconocido que el consumo de este tipo de alimentos tiene una base biológica y es estimulado tanto por factores ambientales como por el estado emocional interno del individuo. Se ha demostrado que dichos alimentos producen un efecto gratificante que refuerza el comportamiento futuro dirigido al consumo de los mismos, ya que poseen la capacidad de activar el sistema de recompensa cerebral de una manera similar al alcohol y las drogas de abuso. En este sentido, se ha observado que las alteraciones en los mecanismos cerebrales son similares, lo que sugiere que el

exceso en la comida acabaría acarreado al desarrollo de trastornos en la conducta alimentaria [135].

Con el fin de estudiar enfermedades metabólicas y/o inducir obesidad en roedores se han desarrollado diferentes dietas con alto contenido de grasa o de azúcar o compuestas por alimentos consumidos regularmente por humanos [136]. Sin embargo, existe una variabilidad sustancial en la composición de estas dietas, ya que la mayoría de ellas consisten en alimento balanceado con un contenido elevado de azúcar y/o grasa adicional, en comparación con las dietas de alimento balanceado estándar, y no representan de manera adecuada a la dieta de estilo occidental (ya que en la mayoría de los casos está compuesta por un solo alimento sólido). Así, con el fin de estudiar la obesidad inducida por “comida chatarra”, se utilizan una variedad de alimentos consumidos por humanos en la actualidad, permitiendo la libre elección de los animales [137]. Estas dietas son ricas en azúcares y/o grasas, por lo que se consideran muy apetecibles, y poseen una alta carga calórica. Particularmente, la dieta “de cafetería” (CAF) es un modelo dietario experimental rico en grasas y azúcares, que refleja la variedad de alimentos de alta palatabilidad y densidad energética prevalentes en la sociedad occidental y asociados con la pandemia de obesidad actual [138]. La misma es utilizada como dieta obesogénica y se compone del alimento balanceado al que se le adiciona una selección de alimentos para humanos de alto contenido energético y palatabilidad que se van variando, de forma que el animal es capaz de seleccionar la comida de acuerdo a sus deseos y necesidades. Por lo tanto, esta dieta tiene la ventaja de permitir la novedad, la elección y la variedad, características clave del ambiente alimentario humano moderno. En animales adultos se ha reportado que la dieta CAF tiene la capacidad de incrementar el peso corporal y la adiposidad e inducir hiperfagia, generando un cuadro de síndrome metabólico [136]. También se ha demostrado que la ingesta de dieta CAF durante el embarazo podría predisponer a la adiposidad y alterar el comportamiento alimenticio en la progenie [10]. Sin embargo, la mayoría de los estudios en este campo se han centrado en los efectos de la dieta sobre el metabolismo y el peso corporal tanto materno como de la descendencia, mientras que el análisis de los circuitos neuronales que regulan la ingesta y promueven el consumo de alimentos altamente palatables han sido menos estudiados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Nuestra **hipótesis** propone que cambios en el control de la ingesta son acompañados por alteraciones en la síntesis de neuroesteroides endógenos en el cerebro, que contribuyen al afianzamiento de una conducta orexígena. Este efecto sería mediado tanto por un desbalance en la vía homeostática del control de la ingesta, representada por los neuropéptidos hipotalámicos orexígenos/anorexígenos, tanto como por la vía no homeostática que involucra el sistema de recompensa. Proponemos que la intervención dietaria prolongada afecta también los sistemas de control de ingesta en la prole, involucrando cambios transmisibles transgeneracionalmente a través de mecanismos no genómicos de naturaleza epigenética.

El **objetivo general** de este trabajo de tesis es ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos homeostáticos y hedónicos que controlan la ingesta y la neuroesteroidogénesis hipotalámica en un modelo de obesidad experimental inducido por una dieta occidental.

Los **objetivos específicos** que se abordarán son los siguientes:

- Objetivo 1: Caracterizar un modelo dietario experimental en el que se induzca obesidad en ratas hembras a través de la ingesta de una dieta “*de cafetería*” (CAF).
- Objetivo 2: Estudiar la progresión en el tiempo de los cambios que se producen durante el tratamiento con dieta CAF, tanto sobre aspectos homeostáticos como hedónicos del control de la ingesta a corto, mediano y largo plazo. Buscamos discernir el desempeño de los núcleos hipotalámicos involucrados en el control homeostático (a través de los niveles de expresión génica de neuropéptidos y receptores hormonales) y en el sistema hedónico (a través de los niveles de expresión génica de receptores, transportadores y enzimas involucradas en la síntesis de neurotransmisores), las ventanas temporales en las que cada sistema ejerce sus acciones predominantes y los vínculos entre la acción de los diferentes núcleos y las señales periféricas hormonales que regulan la ingesta.
- Objetivo 3: Estudiar si la dieta CAF afecta la síntesis endógena de neuroesteroides, particularmente Alopregnanolona, Progesterona y Estradiol, midiendo la expresión hipotalámica de las principales enzimas involucradas en su síntesis. La determinación de las mismas en distintos núcleos hipotalámicos nos permitirá evaluar si hay expresión diferencial de las mismas en estas zonas.
- Objetivo 4: En los casos en que la expresión de alguno de los genes en estudio se encuentre alterada, se medirán los correspondientes niveles de proteína mediante inmunohistoquímica cuantitativa y/o western blot.
- Objetivo 5: Investigar los posibles mecanismos por los que se haya alterado la expresión de los genes target, analizando posibles modificaciones epigenéticas de secuencias regulatorias de dichos genes.

- Objetivo 6: Evaluar los cambios en la conducta hacia los alimentos de los animales alimentados con CAF a través de un test de saciedad sensorial específica, en la actividad locomotora y en la interacción social.
- Objetivo 7: Determinar si la dieta CAF materna afecta los sistemas de control de ingesta homeostático y hedónico en la progenie (F1).

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES.

Se emplearon ratas (*Rattus norvegicus*) hembra de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Según la capacidad de producción y cría del bioterio, se trabajó con un número total de 84 animales, los cuales fueron destetados en el día postnatal 21 (DPN21) y asignados al azar a cada grupo experimental. Durante todo el experimento los animales fueron mantenidos en jaulas colectivas de 2 animales, con acceso libre a comida y bebida y en condiciones controladas (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y 14 hs de luz). Todos los animales utilizados fueron manipulados de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos [139] y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL.

3.2 INTERVENCIÓN DIETARIA.

Al destete, los animales se dividieron al azar en dos grupos, de forma tal que el peso corporal promedio de cada uno fuese equivalente ($36 \pm 2\text{g}$). Cada grupo fue alimentado con dieta control (C), compuesta por alimento balanceado para roedores (Cooperación, ACA Nutrición Animal, Buenos Aires, Argentina), o con una “dieta de cafetería” (CAF), conformada por alimentos para humanos de alto contenido energético y palatabilidad. La dieta C provee un promedio de 3 kcal/g, con una composición de macronutrientes de 15% de grasas, 30% de proteínas y 55% de carbohidratos. Por su parte, la dieta CAF provee un promedio de 4,85 kcal/g, con una composición de macronutrientes de 46% de grasas, 8% de proteínas y 46% de carbohidratos. Para el diseño de la misma se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de seleccionar una serie de alimentos ricos en grasas y/o hidratos de carbono, que posean una composición similar a la reportada en la bibliografía [9,140,136,141,8,138] y que estén disponibles en el mercado local. Los mismos se administraron en grupos de tres - junto al alimento balanceado - y fueron renovados cada dos días, de forma de mantener la variedad para no producir acostumbamiento en los animales [9,140,141]. Para evaluar los efectos de la ingesta de dieta CAF a lo largo del tiempo, la intervención dietaria se realizó durante un período de 4 (corto plazo), 11 (mediano plazo) o 20 semanas (largo plazo). Dichos períodos de tiempo se eligieron en función de la diferencia en el peso corporal entre los animales de ambos grupos dietarios. De este modo, quedaron conformados seis grupos de trabajo en función la duración de la intervención dietaria: C4 (n = 10), CAF4 (n = 10), C11 (n = 10), CAF11 (n = 10), C20 (n = 10) y CAF20 (n = 10).

Para el estudio de la progenie (F1), luego de 14 semanas de dieta 10 hembras de cada grupo dietario que se encontraban en fase de proestro del ciclo estral [142] fueron colocadas con

machos de fertilidad comprobada sin tratar, comprobándose la preñez a través de la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal, considerado día gestacional 1 (E1). Las hembras preñadas fueron luego alojadas en forma individual en jaulas para maternidad (46 x 30 x 30 cm), y se continuó con la dieta correspondiente. En el día gestacional 21 (E21) la mitad de las hembras preñadas bajo cada intervención dietaria fueron sacrificadas y se obtuvieron sus embriones hembra, que también fueron sacrificados, conformándose los grupos C-E21 y CAF-E21 ($n = 12/\text{grupo}$). El sexo fue determinado observando la distancia ano-genital, visiblemente mayor en machos que en hembras [143]. El día E21 fue elegido ya que representa un punto de la preñez muy cercano al nacimiento, donde el entorno nutricional es proporcionado a través de la placenta. El resto de las hembras preñadas fueron mantenidas bajo la dieta correspondiente durante el resto de la preñez y la lactancia, hasta el día posnatal 10 (DPN10) de la progenie, momento en el cual fueron sacrificadas las crías hembra, conformando los grupos C-DPN10 y CAF-DPN10 ($n = 12/\text{grupo}$). Este día se seleccionó como un punto representativo del periodo de lactancia, donde la transferencia nutricional se da exclusivamente por la leche, ya que aún existe una lactancia absoluta.

El diseño experimental se puede resumir en el esquema de la Figura 9. Durante toda la experiencia, se registró semanalmente el peso corporal y diariamente la cantidad de cada alimento suministrado, así como el resto no ingerido para calcular la ingesta másica por diferencia. De este modo, con los datos provistos en la Tabla 5, se calculó la ingesta energética total tal como se ha reportado anteriormente [144].

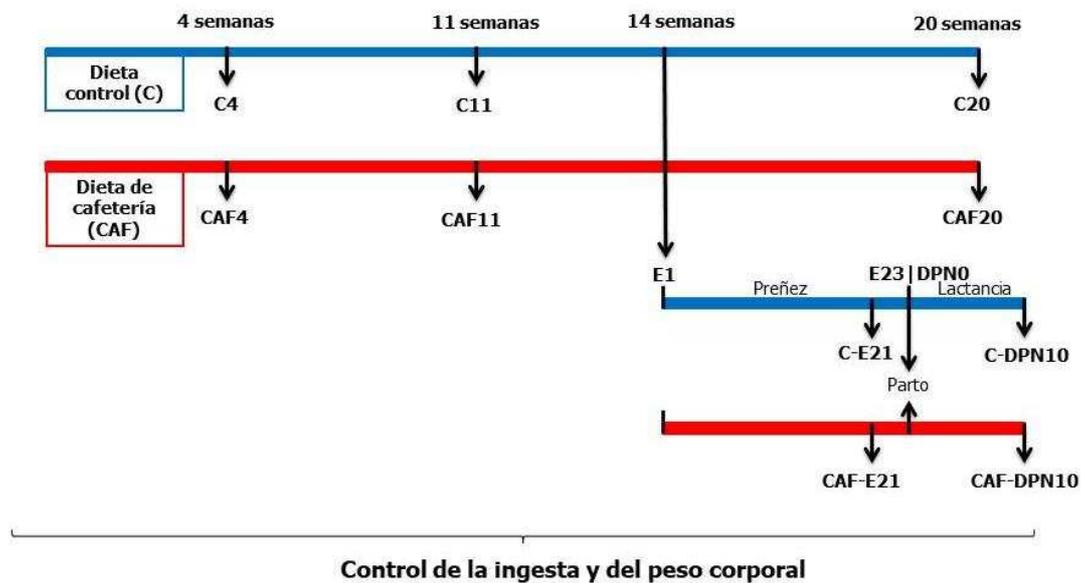


Figura 9. Esquema del modelo dietario realizado en hembras alimentadas con dieta Control (C) o de cafetería (CAF) durante 4, 11 y 20 semanas y obtención de la progenie.

3.3 TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA GLUCOSA.

En la semana 19 de dieta se realizó un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. Luego de 12 horas de ayuno, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de glucosa (2

g/kg). Se tomaron muestras de sangre de la cola y se midió la concentración de glucosa utilizando un glucómetro (Accu-Chek Performa Nano meter, Roche Diagnostics, Alemania) a tiempos 0 (ayuno), 30, 60, 90 y 120 minutos post inyección [145]. Se calculó el área bajo la curva de glucosa a lo largo del test utilizando el software Origin Lab.

3.4 TESTS DE CONDUCTA.

3.4.1 *Test de saciedad sensorial específica (TSSS).*

Al final de la intervención dietaria en el corto y mediano plazo los animales fueron sometidos a un test de conducta en jaulas individuales, adaptado de Reichelt y *col.* [93]. Se emplearon dos soluciones coloreadas con igual contenido calórico: sacarosa al 10% p/v con colorante rojo y maltodextrina al 10% p/v con colorante azul (Figura 10). Las mismas fueron previamente probadas en un pequeño lote de animales y demostraron ser igualmente preferidas y discriminadas.

El test se desarrolló en 4 días consecutivos, durante la fase luminosa del día, entre las 09:00 y las 13:00 hs. Durante esos días los animales tuvieron libre acceso a la comida correspondiente a cada grupo experimental, pero horarios restringidos de acceso al agua de bebida (2 horas por día, entre las 13:00 y 15:00 hs). Los primeros 2 días los animales fueron familiarizados con ambas soluciones en dos sesiones de 20 minutos cada una, separadas por un intervalo de una hora. En cada sesión se presentó una sola de las soluciones. Al tercer día se realizó una pre-exposición a una de las soluciones por 20 minutos, y luego de dos horas se llevó a cabo el *choice test* exponiendo los animales a las dos soluciones en simultáneo, dándoles la posibilidad de elección. Al cuarto día se realizó la pre-exposición a la otra solución y nuevamente el *choice test*, permitiendo una comparación intra-sujetos. En cada una de las etapas se midió el volumen consumido por cada animal, lo cual fue analizado y presentado en gráficos separados—familiarización, pre-exposición, *choice test* y preferencia—. Para la construcción del gráfico de preferencia se tuvieron en cuenta los volúmenes consumidos de la solución a la que habían sido pre-expuestos, que representa lo “conocido”, y de la solución a la que no habían sido pre-expuestos, que representa la “novedad”. En cada intervalo entre las sesiones los animales fueron devueltos a las jaulas colectivas.



Figura 10. Desarrollo del test de saciedad sensorial específica en jaulas individuales.

3.4.2 Test de locomoción y test de interacción social.

El test de locomoción provee medidas simultáneas de locomoción, exploración y ansiedad. Por su parte el test de interacción social da idea no sólo del nivel de sociabilización del animal con sus compañeros, sino que una disminución en la misma indica un aumento en la ansiedad [146]. En ambas pruebas el animal se colocó en el centro de una caja metálica de color negro opaco de 80cm x 80cm x 60cm (“campo abierto”), que se encuentra en una sala especial aislada de ruidos ambientales y que posee una cámara de video conectada a una computadora y ubicada a 1m por encima de la base del campo abierto. Ambos test se realizaron a las 4, 11 y 18 semanas, en los animales destinados a cumplir 20 semanas de dieta. Para el test de locomoción esto se realizó sólo una vez, en la cual se filmó y estudió la actividad del animal en el campo abierto durante 5 minutos. En el test de interacción social el procedimiento se repitió 3 días seguidos durante 5 minutos cada vez, para la habituación del animal al campo abierto, al operador y al ambiente. En el cuarto día el animal se enfrentó a otro del mismo grupo dietario pero de menor edad durante 5 minutos, donde su actividad fue filmada. Después de cada prueba, se limpió el campo con alcohol 70° de forma de eliminar el olor de los animales previamente testeados.

Para el análisis informático se utilizó el software Image Pro Plus 5.0. La base del campo abierto se dividió en 9 cuadrantes y se cuantificaron, para el caso del test de locomoción, las siguientes variables: tiempo que el animal pasó en el centro del campo, frecuencia con que se paró en dos patas o cruzó líneas y número de bolos fecales. El número de veces que el animal cruza las líneas delimitadas en el campo abierto se utiliza como medida de la actividad locomotora y de la distancia recorrida y las que se paró en dos patas como medida de exploración y ansiedad. Una alta frecuencia de estos comportamientos indica un aumento de la locomoción y la exploración y / o un menor nivel de ansiedad [147,148]. Por otro lado, la tigmotaxis es la tendencia del animal a permanecer cercano a los bordes del campo abierto y es directamente proporcional a los niveles de ansiedad. De esta manera, un animal que pasa mayor tiempo en el centro del campo es indicativo de bajos niveles de ansiedad [147]. Además, también contabilizamos el número de bolos de materia fecal en el campo abierto, siendo el número de bolos directamente proporcional a los niveles de ansiedad del animal [147]. En el test de interacción social se analizaron la evasión (Al ser solicitado, el animal evita el contacto al saltar, correr o alejarse del compañero), el seguimiento (El animal persigue al compañero o avanza o corre en su dirección) y la exploración social (El animal olfatea, lame o asea cualquier parte del cuerpo del compañero, incluyendo el área anogenital) [98]. El seguimiento y la exploración social son conductas típicas de juego social, mientras que la evasión indica efectos ansiogénicos [149].

3.5 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y DISECCIÓN DE LOS CEREBROS COMPLETOS.

Al finalizar la intervención dietaria, los animales fueron ayunados por 12 hs y eutanizados en el primer día de la fase diestro del ciclo estral, con el fin de mantener condiciones endocrinas similares [150]. Para obtener las muestras correspondientes a los grupos C-E21 y CAF-E21, la mitad hembras preñadas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina. Luego, se procedió a retirar los embriones por medio de la apertura del abdomen y del útero materno con ayuda de tijeras quirúrgicas, de donde fueron extraídos manteniendo las condiciones de esterilidad. Los embriones fueron pesados, y luego la cabeza completa fue separada con ayuda de una tijera quirúrgica y congelada en hielo seco sobre un papel aluminio estéril. Luego, fue conservada a -80°C hasta su microdissección.

Para obtener el cerebro completo de los animales de los grupos C-DPN10, CAF-DPN10, C4, CAF4, C11, CAF11, C20 y CAF20, se colocó la cabeza del animal en una placa de Petri refrigerada y se procedió a retirar la piel y la musculatura cefálica mediante el uso de una tijera quirúrgica, manteniendo las condiciones de esterilidad requeridas para ensayos de biología molecular. Seguidamente, se separaron los huesos craneales mediante un corte sagital medial del cráneo a través de la sutura sagital. Rápidamente, con ayuda de una pinza, se procedió a la extracción del cerebro separándolo del cráneo por corte de los nervios ópticos. Algunos de los cerebros (n = 6-8) fueron destinados a técnicas de biología molecular, para esto el cerebro completo se colocó en posición ventral hacia arriba en hielo seco sobre un papel aluminio estéril. Una vez que el mismo estuvo congelado completamente, se envolvió en el papel aluminio y fue conservado a -80°C hasta su microdissección. Por su parte, los cerebros destinados a técnicas de inmunohistoquímica (n = 4) una vez extraídos del cráneo fueron colocados en posición ventral hacia arriba sobre una tabla de microdissección. Seguidamente, mediante la ayuda de una lupa estereoscópica y un bisturí, fueron cortados de manera coronal a la altura de los bulbos olfatorios y del cerebelo y fijados en paraformaldehído 4% (p/v) para su posterior tratamiento histológico.

3.6 OBTENCIÓN DE LAS REGIONES CEREBRALES DE INTERÉS: MICRODISECCIÓN.

Los 6-8 cerebros congelados de cada grupo fueron incluidos en medio de montaje para congelación (Cryoplast, Biopack, Buenos Aires, Argentina) y utilizando un criostato (CM1850, Leica, Nussloch, Germany) a -12°C fueron cortados coronalmente en secciones de 300 µm de espesor. Mediante la técnica de Micropunción de Palkovits [151] y guiándonos según las coordenadas del atlas estereotáxico Paxinos [152] se aislaron los distintos núcleos y áreas de interés asociados al sistema homeostático y hedónico de control de la ingesta: PVN, VMN, ARC, HL, ATV, NAcSh, NAcC, VP, BLA, CeA (Figura 11a). Para esto se realizó una punción con aguja de acero inoxidable para micropunción de 1,0 mm y las áreas extraídas fueron recolectadas

en tubos eppendorf de 1,5 ml conteniendo 200 μ l de reactivo TRIzol (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), donde se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Para determinar la reproducibilidad de las áreas microdisecadas, la topografía de las secciones fue observada bajo microscopio estereoscópico (Stemi 305, Zeiss, Oberkochen, Germany).

En el caso de la progeñie, las muestras congeladas se incluyeron en medio de montaje (Cryoplast, Biopack) y fueron cortadas en criostato (CM1850, Leica) a -12°C en secciones coronales de 150 μm (para los grupos E21) o 200 μm (para los grupos PND10). Los distintos núcleos y áreas de interés se aislaron mediante la técnica de Micropunción de Palkovits [151] utilizando una aguja de acero inoxidable para micropunción de 1,0 mm y guiándonos según las coordenadas del atlas estereotáxico para el sistema nervioso de ratas en desarrollo Paxinos [153] (para los grupos E21 - Figura 11b) o el atlas estereotáxico de cerebro de ratas en periodo postnatal [154] (Figura 11c). Dado el pequeños tamaño de estos cerebros y sus diferencias neuroanatómicas con los cerebros de animales adultos, se disecaron áreas generales: Área hipotalámica periventricular (AHP, conteniendo los núcleos PVN, VMN y ARC), Área hipotalámica lateral (AHL, zona enriquecida en HL), ATV, NAc, BLA, CeA (sólo para los grupos DPN10). Las áreas extraídas fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1,5 mL conteniendo 200 μ l de reactivo TRIzol (Invitrogen) y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Para determinar la reproducibilidad de las áreas microdisecadas, la topografía de las secciones fue observada bajo microscopio estereoscópico (Stemi 305, Zeiss).

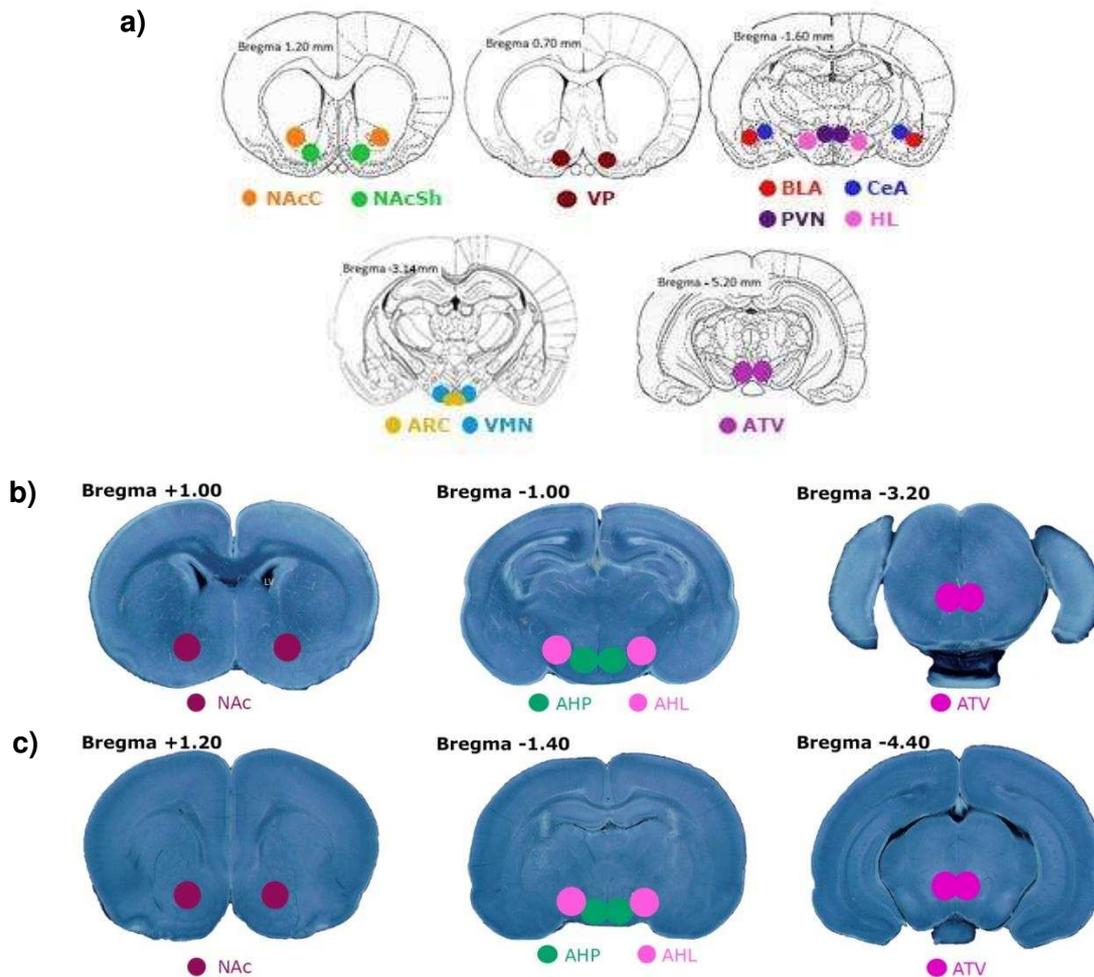


Figura 11. Esquema de las regiones específicas del cerebro aisladas en (a) C4, CAF4, C11, CAF11, C20 y CAF20; (b) Grupos E21; (c) Grupos DPN10. Tomado y adaptado de los atlas Paxinos [152,153] y Khazipov [154].

3.7 OBTENCIÓN Y DETERMINACIONES EN LAS MUESTRAS DE SUERO.

Para la obtención del suero, se recolectó la sangre troncal de los animales en tubos de vidrio. Para facilitar la retracción del coágulo los tubos se incubaron en estufa a 37°C por 30 minutos y luego se centrifugaron para la separación del suero, que fue conservado a -80°C hasta su posterior uso.

Para determinar el impacto del tratamiento sobre diversos aspectos metabólicos se determinaron las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol total utilizando kits comerciales (Wiener Laboratorios, Argentina). Además, se evaluaron los niveles de hormonas circulantes por radio-inmunoensayo: insulina, leptina y E₂[155]. A su vez, se evaluó la resistencia a la insulina de acuerdo al índice HOMA (del inglés *homeostatic model assessment*), calculado como [insulina en ayunas (UI/ml) x glucosa en ayunas (mol/l)] / 22,5 [156].

3.8 OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS ADIPOSOS.

El cuerpo de los animales se colocó sobre una tabla de disección con el abdomen hacia arriba y se desinfectó con alcohol 70° el campo quirúrgico. Utilizando tijeras se realizó una

incisión en la línea media del abdomen y dos cortes perpendiculares al anterior a la altura de las patas traseras. En primer lugar, utilizando tijeras y con la ayuda de una pinza, se identificó y escindió el tejido adiposo perigonadal (TAPg), luego el retroperitoneal (TARP) y por último el subcutáneo (TAS), cuyos pesos fueron registrados.

3.9 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

- ***Extracción de ARN total.***

Las muestras de tejido de las áreas específicas del cerebro aisladas fueron homogenizadas individualmente mediante jeringa y aguja en el reactivo TRIzol y el ARN total fue extraído de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El rendimiento de la purificación y la concentración del ARN fueron estimados mediante absorbancia a una longitud de onda de 260 nm medida en espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), utilizándose solamente aquellas muestras con una relación de absorbancias A_{260}/A_{280} mayor a 1,9. Las mismas se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

- ***Transcripción reversa (RT).***

Cantidades equivalentes de ARN (1 μg) fueron retro-transcriptas a ADN copia (ADNc) con transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (300 U; Promega, Madison, WI) usando 200 pmoles de hexanucleótidos al azar (Promega). Veinte unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAout; Invitrogen) y 100 nmoles de una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) fueron agregados a cada tubo de reacción en un volumen final de 30 μl de buffer de transcriptasa reversa 5X. La reacción de retro-transcripción se realizó en termociclador T18 (IVEMA, Buenos Aires, Argentina) durante 90 minutos a 37°C , 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 80°C . La reacción fue finalizada mediante calentamiento a 94°C durante 30 segundos y posterior enfriamiento en hielo. El ADNc obtenido se llevó a un volumen final de 60 μL con agua libre de ribonucleasas y se almacenó hasta su utilización a -20°C .

- ***Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR).***

Luego de realizada la extracción del ARN total y posterior RT, se evaluaron los niveles de expresión de diversos genes de interés para cada región del cerebro utilizando qPCR. Los transcriptos fueron amplificados y cuantificados utilizando el sistema Real Time DNA Step One Cycler (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados utilizando el programa Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA) y se encuentran detallados en la Tabla 1. Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen ribosomal L19. La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* usando el software Vector NTI. La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible

en la página web del *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para la reacción de qPCR, 5 µL de cada ADNc fueron combinados con HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica, Rosario, Argentina) y 10 pmol de cada oligonucleótido (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 20 µL. Luego de una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, la mezcla de reacción fue sometida a 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación a 52-60°C por 15 segundos, y extensión a 72°C por 15 segundos. Todas las muestras fueron amplificadas por triplicado. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) [157]. El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el programa de análisis *Step One Software* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (L19) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyeron a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc y posterior construcción de la recta con el correspondiente Ct vs. el logaritmo de la dilución del ADNc, obteniéndose la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la Ef ($Ef=10^{(-1/pendiente)-1}$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 98% y 102%. No se observaron diferencias significativas en los valores de Ct de la proteína ribosomal L19 entre los grupos experimentales.

Los niveles de expresión de las muestras experimentales sobre los valores controles se calcularon utilizando el método de la curva estándar relativa Ct vs. log CR, donde CR es Concentración Relativa. [158]. Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen de referencia *L19* fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen *L19* en cada grupo experimental.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qPCR para estudios de expresión génica.

Enzima / Proteína	Oligonucleótido sentido (5' → 3')	Oligonucleótido antisentido (5' → 3')
L19	AGCCTGTGACTGTCCATTCC	TGGCAGTACCCTTCCTCTTC
POMC	CCTCCTGCTTCAGACCTCCATA	TGTTTCATCTCCGTTGCCTGG
CART	GCTCAAGAGTAAACGCATTCC	AAGAATTGCAAGAAGTTCCTCG
AgRP	TTGGCAGAGGTGCTAGATCCA	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC
NPY	CTTAATGAGAGAAAGCACAG	AACTAGGAAAAGTCAGGAGA
OX	AGCCTCTGCCCCGACTGCT	GTGGTTGCCAGCTCCGTG
ObRb	AGGATGAGTGTGTCAGAGTCAA	CTCTTCATCAGTTTCCACTG
RIns	TCTCTCCAGGAAACTACAGTGT	AAAATAGGTGGGTTCTGTCC
GhSR	GCTCTGCAAACCTCTTCCA	AAGCAGATGGCGAAGTAG
TH	TACCAAGATCAAACCTACCAGCC	GGTCAAACCTCACAGAGAATGGG
DRD1	TCCAAGGTGACCAACTTCTT	GTTACAAAAGGACCCAAAGG
DRD2	CCCAGCAGAAGGAGAAGAAA	CAGGATGTGCGTGATGAAGA
DAT	CATCACCACCTCCATTAACCTCC	CATTGTGCTTCTGTGCCATG
MOR	AAGCCCTGGATTTCGGTAC	CCCCTGCCTGTATTTTGTG
HCRTR1	TCTCAGCTTCATCGCCCT	ATGACAGCCAGCGACACA
HCRTR2	AAGAATATGAGTGGGTCTGATC	GGTTGACTATGAAGTAGTTGGTGAC
GAD1	ACAAGGCGATTCAGTGTGGC	CCAGCTCCAGGCATTTGTTG
GAD2	GCTCTGGCGATGGAATCTTT	CTTATAGCGGGCAATGAGCA
StAR	GCAAAGCGGTGTCATCAG	GGCGAACTCTATCTGGGTCT
3 α -HSD	GCACTCAACTGGACTATGTGGA	GCTCATCTCGTGGGAAAAAT
3 β -HSD	AGGCCTGTGTCCAAGCTAGTGT	CTCGGCCATCTTTTTGCTGTAT
ARO	TGGCAGATTCTTGTGGATGG	CGAGGACTTGCTGATGATGAGT
5 α -R	CACCTTCAACGGCTATGTAC	AGGATGTGGTCTGAGTGGAT
RP	GACCAGTCTCAACCAACTAGGC	ACACCATCAGGCTCATCCAG
RE α	ACTACCTGGAGAACGAGCCC	CCTTGGCAGACTCCATGATC

RP: Receptor de progesterona.

3.10 ESTUDIOS DE EPIGENÉTICA.

- *Análisis bioinformático.*

Los promotores *Pomc*, *Npy* y *Agrp* y dos activadores del gen *Pomc* (nPE1 y nPE2), previamente descritos por otros autores [131,159,39,160], y los genes de las moléculas involucradas en la vía dopaminérgica: *Th* (NC_005100.4), *Drd1* (NC_005116.4), *Drd2* (NC_005107.4) y *Dat* (NC_005100.4) fueron analizados en busca de islas CpG utilizando el programa *Methyl Primer Express Software* v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Una isla CpG es definida como una secuencia de ADN igual o superior a 200pb, con un porcentaje de GC mayor al 50% y un promedio de CpG observado/esperado mayor a 0.6 [161]. Luego se determinó si estas secuencias contenían sitios de reconocimiento para las enzimas sensibles a metilación *BstUI* y/o *Mae II*. Para determinar la presencia de sitios de unión a factores de transcripción se utilizó la herramienta informática PROMO [162]. Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa *Vector NTI Suite* v6.0 (Informax Inc., North Bethesda, MD, USA) y se muestran en la

Tabla 2. Las regiones promotoras de 5 α -R, 3 α -HSD y ARO han sido descritas y estudiadas anteriormente por nuestro grupo [104,134], los oligonucleótidos utilizados se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los análisis del estado de metilación de ADN.

Gen	Oligonucleótido sentido (5' → 3')	Oligonucleótido antisentido (5' → 3')
POMC		
<i>Cm</i>	GGTGAAGGCTGTCAGACAATC	CCAAACTCCAAGGGAAAGG
<i>Mae II (a)</i>	CAGGAAGGTCACGTCCAAGG	CCGTTTGGTCCCTGTCACTC
<i>BstUI (b)</i>	GAGTGACAGGGACCAAACGG	CAGGAGCCGAGACACCCTTA
nPEI		
<i>Cm</i>	TAAGGGGCTAAAGGACCAAG	CTGCTCCACAACAGAACCAA
<i>Mae II/BstUI</i>	TCAGACTGGTGACTGCTGGC	GGACTTCCTGGAGGTGCAGT
NPY		
<i>Cm</i>	GTCCCTTGCTCAAAAGTGGC	CATCGGTCAAAACCTGGGTC
<i>BstUI (a)</i>	TTCCAGAGGCATTAAGTCAAGC	AAAAGACCAACGCCACTGTG
<i>BstUI (b)</i>	TCGCAGTTGTCCCAGAGATG	GGACCGCTTAGATTGCCTGT
<i>BstUI (c)</i>	GGAAGTGGCTGTGGGAGTCA	CTGCGAGGAATGAGCTCCAC
TH		
<i>Cm</i>	CCATCAGATTTACCTAGAAGC	TGAGACTATGAAGGGACATTG
<i>Mae II (a)</i>	ACAGCAGGCGTGGAGAGGAT	TGGTGGTCCCAGTTCTGTG
<i>Mae II (b)</i>	CCTTAGGAAATCCAGCATGG	ATTGCATCCACTGTCACAGG
<i>Mae II (c)</i>	CATGTGGCTGCTCCTATGTA	GAGAGAGATTGGCACACACA
DRD1		
<i>Cm</i>	GTGGTGAGAATCCCCTCAGG	AGTTCCACAGGCGGAGAACC
<i>Mae II</i>	CAGGCAAAGAGGTTCAACAAG	CCGCCATCTAAACAGTTACC
<i>BstUI</i>	AGCAGGAAACCACAGGCACC	GCTTCTGCGGTCAACTCACG
DRD2		
<i>Cm</i>	AATTCTGTGGTGCCTTCTCCT	ATGGGGTCAATCCAGAGTAGA
<i>Isla CpG</i>	AGTGCAGAGATAGTTCTGGG	AGAAGCCACAGACTGTCGTT
DAT		
<i>Cm</i>	TTTGGGGTCTCAACTAGAAA	TAAGACCTTTTCAGAACCCA
<i>BstUI(a)/MaeII</i>	CTTCTGACAACCTCGCTGGA	GGGGCTTGACAGGAGTCTTT
<i>BstUI(b)/SmaI</i>	CGTACAACACCGAAGGAAGA	CGAGGTTGTCAGAAGCAGAT
3α-HSD		
<i>Cm</i>	CAGAGAAGGAAGTTTGAATC	ATGTCAGATCACTTGGGAAGT
<i>MaeII(a)</i>	ACTGATTTTTGCTTAGGCTG	AAAATTCTGTAGTGAGCCGT
<i>MaeII (b)</i>	GGATGTGGCTGGAATACAGA	TTCTGTCACTTTGTCTGCC
<i>Mae II (c)</i>	GAAACATTGTGTCTGTATGG	GTAAATTGTTAAGGGGAGAC
5α-R		
<i>Cm</i>	CAACTTTCTGTCCATCTACC	CTTACAACCTCTCCTTTTCG
<i>BstUI (a)</i>	CACCTTCCCAGCCCTGACAG	AGGTGCCAGGAGAGAGGGGT
<i>MaeII (b)</i>	AGTCAAGAAATATGCCTGAA	AATACGTTCTCGGTATGAAT
<i>MaeII (c)</i>	CCACTAAGCGTGAATCTCTC	AACACTCCATGACTCTCTGC
<i>MaeII (d)</i>	CTGCTGGCTATGTTTCTGAT	TGGAATTAAGTCTCTGAGCC
ARO		
<i>Cm</i>	ACTCAAGGGCAAGATGATAA	AGTGACAAGGCAAGACAAAT
<i>MaeII</i>	CTGGAGTAGGAGCCTTACC	CTTGAGTGGGTAGAGTGACG

- **Análisis del estado de metilación del ADN.**

Para evaluar el estado de metilación del ADN en las regiones de interés de los genes de *Pomc*, *Npy*, *Agrp*, *Th*, *Drd1*, *Drd2*, *Dat*, *5α-R*, *3α-hsd* y *Aro* se utilizó la técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación seguida de qPCR (MSRE-PCR) [104]. En primer lugar, a partir de muestras de tejido de las áreas específicas del cerebro aisladas y utilizando el reactivo TRIzol se realizó la extracción de ADN genómico (ADNg) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La concentración total de ADNg fue determinada por medición a A_{260} y el ADN fue almacenado a -20°C . Entre 0,3 -0,6 μg de ADNg fue digerido con 10 unidades de *BstUI* (New England BioLabs, Beverly, MA) o 1 unidad de *Mae II* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) o *SmaI* (Promega, Madison, WI) en buffer enzimático 1X durante 1 hora a 60°C , 50°C o 25°C , respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de digestión fueron purificados con el *kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI). El nivel de expresión relativa de las diferentes regiones del ADN fue analizado mediante qPCR (tal como se describió previamente), utilizando los oligonucleótidos listados en la Tabla 3. Cada muestra fue cuantificada por duplicado o triplicado. Como control interno (CI) se amplificó una región del gen que no contenía sitios *BstUI*, *Mae II* o *SmaI* (control normalizador). Cuando un sitio CpG está metilado no puede ser digerido por *BstUI* o *Mae II* y el producto es amplificado. Contrariamente, si el sitio no está metilado, las enzimas cortan la secuencia y no hay amplificación del fragmento. Los niveles relativos de metilación se calcularon utilizando el método de curva estándar relativa previamente descrito [158].

3.11 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.

- **Procesado histológico.**

Los cerebros fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante 48 h a 4°C . Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH: 7.5) de 10 min cada uno y se mantuvieron los tejidos en una solución de alcohol 70° . Durante el protocolo de procesado, las muestras fueron deshidratadas en series de etanol de graduación creciente, clarificados en xilol y embebidas en parafina fundida, en estufa a 60°C . El calor provocó la evaporación de los restos del solvente (xilol) y de esta forma, los espacios ocupados por éste fueron impregnados por la parafina. Luego se colocó la muestra en un recipiente con parafina fundida y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Esto permitió obtener un bloque de parafina denominado “taco” con el tejido en su interior. Obtenido el taco, se realizaron cortes histológicos seriados de $5\ \mu\text{m}$ de espesor en micrótopo (Leica, Jung RM2025, Leica Instruments GMT, Nussloch, Alemania) que se montaron en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma-Aldrich) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs. Estas muestras fueron utilizadas para análisis mediante inmunohistoquímica (IHQ), lo cual permitió determinar la expresión de diferentes proteínas de interés.

- **Inmunohistoquímica.**

La técnica de IHQ permite identificar *in situ* un antígeno celular mediante una reacción antígeno-anticuerpo, que se visualiza gracias a una molécula marcadora. Para la inmunomarcación de RE α , RP, ARO y 5 α -R se utilizaron anticuerpos de producción propia y se siguió un protocolo previamente publicado que utiliza el calentamiento de la muestra en horno microondas como método de recuperación antigénica, estreptavidina-peroxidasa como sistema de revelado y NiCl₂ en una solución de diaminobencidina (DAB) como cromógeno [163]. El protocolo general empleado se resume en la Tabla 3. En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad, sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmune, y controles positivos, que consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue comprobada con anterioridad.

Tabla 3. Protocolo general de la técnica de IHQ.

Desparafinización e hidratación	
Xilol 1, 2 y 3	3 pasajes de 3 min c/u
Alcohol 100°, 96° y 70°	3 pasajes de 3 min c/u
PBS	5 min
Recuperación Antigénica	
Buffer citrato 0,01M pH=6,00 en horno microondas:	
Potencia al 100% sin muestras	3 min
Potencia al 100% con muestras	5 min + 3 min + 3 min
Apagado	20 min
PBS	10 min
Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena	
H ₂ O ₂ al 3% en metanol	15 min
PBS	15 min
Bloqueo de uniones inespecíficas	
Suero normal de cabra 1/20 diluido en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada	30 min (en cámara húmeda)
Anticuerpo Primario	
Incubación con anticuerpo específico:	
RE α : ER200 (LETH – ISAL), dilución de trabajo: 1/50	14-16 hs a 4°C (en cámara húmeda)
RP: PR130 (LETH – ISAL), dilución de trabajo: 1/200	
ARO: AROM (LETH – ISAL), dilución de trabajo: 1/500	
5 α -R: 5 α R (LETH – ISAL), dilución de trabajo: 1/500	
PBS	15 min
Sistema de Revelado	
Anticuerpo Secundario: Anti-ratón biotinilado (LETH – ISAL) 1/200	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Estreptavidina- Peroxidasa (Sigma, Aldrich) 1/150	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5min
Sustrato enzimático (5 μ l de H ₂ O ₂ 30 vol) + cromógeno (1,65 mg DAB + 40 mg NiCl ₂) disueltos en 3,3 ml Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5)	6-10 min
Agua destilada	5 min
Deshidratación	
Alcohol 70°, 96°, 100° I y 100° II	3 pasajes de 1 min c/u
Xilol 1 y Xilol 2	2 min y 5 min
Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma, Aldrich)	

3.11.1 Generación de un anticuerpo policlonal anti-ARO y anti-5 α -R.

Para estudiar la expresión de las proteínas ARO y 5 α -R mediante ensayos de IHQ generamos previamente los anticuerpos policlonales como se detalla a continuación.

- **Diseño bioinformático, amplificación, clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión de los antígenos de ARO y 5 α -R.**

La región de la secuencia de los genes de ARO (NM_017085.2) y 5 α -R (NM_017070.3) que se utilizó para generar el antígeno fue seleccionada utilizando la herramienta BioPlot del programa informático Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc.), capaz de identificar zonas proteicas con alta antigenicidad teórica. Para la producción del antígeno se utilizó una estrategia de clonado direccional *EcoRI* – *XhoI*, amplificando por PCR las secuencias nucleotídicas de las regiones antigénicas seleccionadas. Para las amplificaciones por PCR se empleó ADNc obtenido de una muestra de ovario de rata y se utilizaron oligonucleótidos diseñados específicamente con el agregado de sitios de corte para enzimas de restricción (*EcoRI*: GAATTC, *XhoI*: CTCGAG) que se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar y clonar las secuencias de Aromatasa (ARO) y 5 α -Reductasa (5 α -R).

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño (pb)
ARO (Sentido)	tggg <u>GAATTC</u> CGGTGACAGAGACATAAGGATTG	180
ARO (Antisentido)	gggg <u>CTCGAGT</u> CATCTTCCGATGTTTCAGAATGATG	
5 α -R (Sentido)	cggg <u>GAATTC</u> CGGCATGGTGATAAATATCCAC	183
5 α -R (Antisentido)	atta <u>CTCGAGT</u> CAGCTGGCCAGTGCAAAGCCAC	

En minúsculas se muestran los extremos 5' no específicos de los oligonucleótidos. En negrita y subrayado se resalta la secuencia de corte de las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Promega) utilizadas para el clonado direccional en el vector de expresión pGEX4T-3.

El producto de PCR obtenido, se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and Clean-Up System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego, cada producto de PCR se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* en Buffer H (Promega) durante 2 horas a 37°C. Los productos de los cortes de restricción fueron purificados y ligados al vector pGEX-4-T3 (Figura 12, Stragene Corp., La Jolla, CA) digerido con las mismas enzimas, durante toda la noche a 4°C utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega). Así, se logró el clonado direccional en el vector de expresión recombinante pGEX-4T-3.

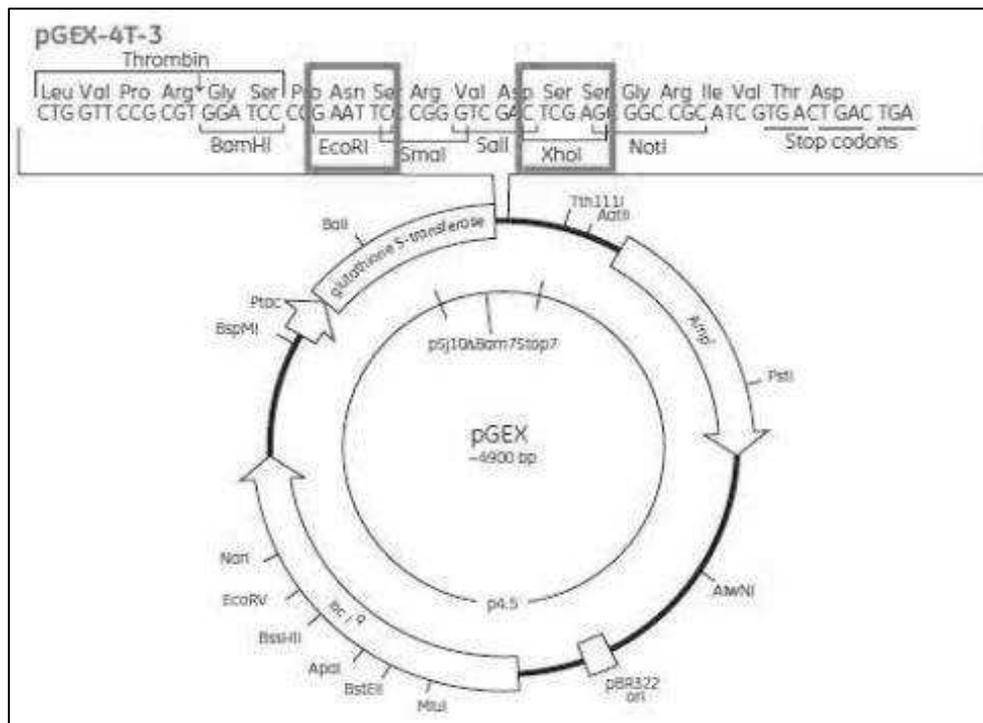


Figura 12. Plásmido pGEX-4T-3 y estrategia de clonado direccional utilizada para la expresión de los antígenos de aromatasa (ARO) y 5 α -Reductasa (5aR) como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-ARO/5aR). Tomado y modificado de GE Healthcare Life Sciences 2014.

De esta forma, el marco de lectura de ARO o 5 α -R queda en fase con el de la Glutacion-S-transferasa (GST, Figura 12). Así, los constructos pGEX-4T-3/ARO o pGEX-4T-3/5aR dirigen la síntesis de la proteína de fusión GST-ARO o GST-5aR, respectivamente. Con los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (Stratagene) por el método de CaCl₂. Se seleccionaron clones de bacterias transformadas al azar y se chequeó por PCR que efectivamente habían sido transformadas con el vector recombinante. Se generaron stocks de esas bacterias y se almacenaron a -80°C.

- **Expresión y purificación de los antígenos recombinantes.**

Para expresar en forma soluble las proteínas recombinantes, células de *E. coli* JM109 (Stratagene) fueron transformadas con el vector pGEX-4T-3/ARO o pGEX-4T-3/5aR y cultivadas en medio Luria Bertani (1% peptona de carne, 0,5% extracto de levadura, 1%NaCl). La expresión de las proteínas de fusión se indujo con el agregado de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Promega) en una concentración final de 250 nM. Luego de la inducción, el cultivo de células fue sonificado en baño de hielo (High Intensity Ultrasonic Processor, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc. Newton, CT, USA) y centrifugado a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y la proteína de fusión fue purificada a partir del mismo utilizando una columna cromatográfica GSTrapTM (GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina). Se recogieron las fracciones de elución, cuya concentración de proteína se estimó determinando la absorbancia a 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida del 5 al 20% para evaluar su pureza relativa. Se juntaron todas las fracciones contenían proteína y se las

concentró utilizando tubos de filtración forzada (Centricon, límite de paso 10 KDa, Millipore, Billerica, MA).

- ***Obtención, purificación y caracterización del anticuerpo policlonal mono específico de conejo.***

a) Inoculación de los conejos:

Una vez obtenidas las proteínas de fusión purificadas (GST-ARO o GST-5aR) se procedió a la inoculación de dos conejos, uno para cada antígeno, de acuerdo al siguiente protocolo [164,165]:

- Se tomó una muestra de sangre de la cual se obtuvo el suero basal y luego se inoculó cada antígeno,
- Se inyectó por vía subcutánea una preparación de 300 μ l de cada antígeno en una concentración de 1 μ g/ μ l disuelto en PBS con 300 μ l de adyuvante completo de Freund,
- 15 días después se realizó una inoculación preparación antes descrita, pero esta vez, se utilizó adyuvante incompleto de Freund. Este procedimiento se repitió dos veces cada 15 días, finalizado el proceso de inoculación a los 60 días de la primera inoculación. Dos semanas luego del último estímulo, los conejos fueron sacrificados, almacenándose los sueros a -20°C.

b) Purificación de los anticuerpos específicos:

Se realizó mediante dos cromatografías de afinidad sucesivas, utilizando columnas cuya matriz se componía de agarosa unida a radicales N-hidroxisuccinamida (NHS) activados (Hi-Trap NHS activated HP, GE healthcare). Estas columnas permiten adherir a la matriz activada, antígenos específicos de los anticuerpos que se desean aislar. En la primera cromatografía, nos hemos propuesto separar del antisuero, los anticuerpos que pudiesen haberse generado contra el péptido de GST (que formaba parte de los antígenos recombinantes inoculados a los conejos). Para ello se adhirió a la columna cromatográfica el péptido de GST obtenido a partir de la expresión en células *E. coli JM109* transformadas con el plásmido pGEX-4T-3, es decir, sin ninguna proteína fusionada a GST. Para ello, 5 mg de proteína GST purificada, se concentraron con tubos Centricon (Millipore) a un volumen final de 1 ml. Esta solución se adicionó a la columna de 1 ml de lecho activado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se desactivaron los grupos NHS activos remanentes y la columna se lavó con PBS, luego con solución de elución (glicina 100 mM pH 3) y finalmente, se equilibró con PBS. Una vez preparada la columna se sembró el antisuero y se lavó con PBS. En esta columna quedan retenidos los anticuerpos contra GST, pasando al percolado la fracción de antisuero que contiene los anticuerpos específicos contra ARO o 5 α -R. De esta manera, el percolado se conserva hasta la siguiente cromatografía. La columna luego se eluye con buffer de elución, y se descarta el eluato que contiene los anticuerpos contra GST. En la segunda cromatografía nos propusimos purificar los anticuerpos específicos contra la proteína de interés (ARO o 5 α -R), descartando otros

anticuerpos o moléculas contaminantes del antisuero. Por lo tanto, para estas cromatografías se emplearon las mismas columnas Hi-Trap NHS activated HP, pero adicionando a la columna de 1 ml de lecho activado, 5-7 mg de proteína recombinante GST-ARO o GST-5aR purificada y concentrada. En este caso el percolado se descartó y los anticuerpos de interés retenidos en la columna se eluyeron y se recogieron fracciones de 1 ml con 60 µl de Tris-HCl 1,5 M pH 8,6 para neutralizar el eluido. Luego se leyó la absorbancia de cada fracción en espectrofotómetro a 280 nm. Las fracciones con absorbancias mayores a 0,2 se juntaron, homogeneizaron y posteriormente se concentraron con tubos Centricon (límite de paso 30 KDa, Millipore) y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas para los inmunoensayos.

c) Caracterización de los anticuerpos generados por Western Blot e IHQ:

Para caracterizar por *Western blot* el anticuerpo anti-ARO producido, se usaron extractos proteicos de ovario (como control positivo). Así, 100 µg de tejido se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4-20%, se corrieron en una cuba electroforética y luego se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en buffer Tris-salino Tween (Tris 25 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH=7,4) a 4°C durante toda la noche para prevenir uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con solución tampón Tris con Tween (TBST) y se incubó con el anticuerpo anti-ARO (diluciones: 1/100 – 1/200 – 1/400) en TBST-leche 2% durante 1:30 h. Luego, la membrana se lavó con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1/200 en TBST-leche 2%) durante 1 h. La membrana se lavó 3 veces con TBST y la reacción se visualizó utilizando como cromógeno DAB 0,5 mg/ml (Sigma). El peso molecular de las proteínas fue determinado utilizando marcadores de peso estándar (Broad Range Protein Markers, Promega, Madison, WI, USA).

Por otra parte, para confirmar la reactividad y especificidad de los anticuerpos generados, se realizaron ensayos de IHQ en tejidos embebidos en parafina usando secciones de útero de rata, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.11 (Tabla 3). Para evaluar la especificidad de los anticuerpos generados, los péptidos antigénicos GST-ARO y GST-5aR fueron utilizados para pre-adsorber el anticuerpo correspondiente, incubando 1 µg del anticuerpo con 10-20 µg del péptido antigénico durante 24 h a 4°C.

3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El peso corporal de los animales, los valores de colesterol y triglicéridos circulantes, el test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa y los test de locomoción y de interacción social fueron evaluados por medio de un test T de Student no pareado de dos colas. Las ingestas en masa y energética fueron evaluadas por ANOVA de medidas repetidas seguido del post test de Bonferroni. Para analizar los pesos de los tejidos adiposos, los valores de glucosa y hormonales séricos y los niveles de expresión génica se aplicó a los valores normalizados un ANOVA de dos

vías utilizando como factores la dieta y la duración de la intervención dietaria. En caso de detectarse interacción entre los mismos, se prosiguió con un ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey. Todos los datos fueron calculados como la media \pm el error estándar de la media (SEM) y se consideró un nivel de diferencia significativa al valor $p < 0,05$ para todos los test estadísticos. Para su análisis se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics 22 software (IBM Inc., Armonk, NY, USA) o el software R versión 3.3.3.

Para evaluar los test de saciedad sensorial específica se realizaron cuatro tipos de análisis estadísticos, utilizando para ello el software IBM SPSS Statistics 22 y el software R versión 3.3.2. Para la familiarización, se empleó un modelo lineal de medidas repetidas, que contempla las repeticiones, las dos soluciones (sacarosa y maltodextrina) y los grupos experimentales (C y CAF). Para la pre-exposición se utilizó un ANOVA para grupos con muestras dependientes, considerando de este modo las soluciones y los grupos experimentales. Para el *choice test* se realizó un test T para muestras relacionadas, que permitió comparar la preferencia por la solución preexpuesta o la novedad dentro de cada grupo experimental; así como un ANCOVA para evaluar la diferencia entre las preferencias de los grupos. En el caso de los test de locomoción e interacción social se realizó un análisis ANOVA de medidas repetidas utilizando como factores la dieta y la duración de la intervención dietaria, seguido de un post test de Bonferroni.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA DIETA DE CAFETERÍA.

En primer lugar y para cumplir con el Objetivo 1, hemos caracterizado los efectos del consumo de una dieta CAF en ratas Wistar hembra. Para el diseño de la misma, se seleccionaron una serie de alimentos ricos en grasas y/o hidratos de carbono disponibles en el mercado local y con una composición y características similar a la reportada en la bibliografía. Dentro de las variables que determinan el modelo experimental en estudio, podemos considerar las atinentes al animal: especie, cepa, sexo, edad, estado fisiológico; y las referentes al modelo dietario: duración de la intervención dietaria, densidad energética de la dieta, tipos de alimentos ofrecidos, índice de recambio de los mismos, entre otros [137,166,167].

Veinticinco alimentos fueron suministrados a un pequeño lote de animales (macho y hembra), con el fin de elegir los definitivos que compondrían la dieta. De este modo se optó por 13 alimentos fáciles de roer y de administrar en las jaulas, con buena palatabilidad para los roedores y estables a temperatura ambiente, entre los que se incluyeron galletitas dulces y saladas, golosinas, snacks y quesos, los cuales se listan en la Tabla 5. La distribución semanal de la dieta (Tabla 6) se organizó de forma de obtener una composición calórica diaria similar (4,85 kcal/g), ofreciendo un promedio de 46% de energía en forma de hidratos de carbono, 8% en forma de proteínas y 46% en forma de grasas.

Tabla 5. Composición centesimal y energética de los alimentos de la dieta de cafetería.

Cada 100 g de alimento	kcal totales	Carbohidratos		Proteínas		Grasas	
		g	kcal	g	kcal	g	kcal
Papas Fritas (Great Value)	556,0	56,0	224,0	6,0	24,0	35,2	316,8
Chizitos (Great Value)	492,0	56,0	224,0	5,2	20,8	27,2	244,8
Bizcochos salados (Don Satur)	516,7	53,3	213,3	9,0	36,0	29,7	267,0
Galletitas Sabor Queso (Club Social)	453,0	68,0	272,0	7,6	30,4	17,0	153,0
Queso Parmesano (La Paulina)	380,0	0,0	0,0	30,0	120,0	28,0	252,0
Bon O Bon (Arcor)	551,0	48,0	192,0	10,0	40,0	36,0	324,0
Rhodesia (Mondelēz)	527,0	62,0	248,0	4,1	16,4	29,0	261,0
Chocolate para taza (Águila)	474,0	55,0	220,0	6,6	26,4	25,0	225,0
Galletitas dulces con chips de chocolate (Toddy)	445,0	60,0	240,0	5,6	22,4	20,0	180,0
Galletitas dulces <i>Waffer Maxi</i> Chocolate (Bauducco)	508,0	63,0	252,0	5,5	22,0	26,0	234,0
Galletitas dulces rellenas (Oreo)	485,0	65,0	260,0	5,7	22,8	22,0	198,0
Mantecol (Georgalos)	530,0	47,0	188,0	15,0	60,0	31,0	279,0
Budín marmolado (Valente)	387,0	63,0	252,0	4,8	19,2	13,0	117,0

Tabla 6. Menú semanal de la dieta de cafetería.

SEMANA 1	
Lunes	Chizitos + Galletitas Club Social + Rhodesia
Miércoles	Chizitos + Galletitas Don Satur + Bon O Bon
Viernes	Galletitas Club Social + Chizitos + Galletitas Bauducco
SEMANA 2	
Lunes	Chizitos + Oreo + Papas fritas
Miércoles	Chizitos + Galletitas Toddy + Budín
Viernes	Galletitas Club Social + Queso Parmesano + Mantecol

4.1.1 Efecto de la dieta CAF sobre la ingesta.

A lo largo de toda la intervención dietaria se registró diariamente la cantidad de cada alimento suministrado y el resto no ingerido, pudiendo calcularse por diferencia la ingesta. Desde la primer semana de dieta se observó una tendencia (dado que sólo fue estadísticamente significativa en algunas semanas) a una menor **ingesta de alimentos** (expresada en gramos) por parte de las hembras CAF respecto a las C, que se mantuvo a lo largo de toda la intervención dietaria (Figura 13). Cuatro semanas de CAF disminuyeron en un 14% tanto la ingesta en masa diaria promedio ($p < 0,0001$) como la ingesta en masa acumulada ($p < 0,0001$) respecto al grupo C, diferencia que en ambos casos se exacerba hacia la semana 20 de dieta (Tabla 7). Al realizar un análisis a lo largo del tiempo, debemos resaltar que entre las semanas 4 a 11 de dieta los animales C incrementan su ingesta en masa diaria promedio en mayor medida que los animales CAF. Sin embargo, entre las semanas 11 y 20 son los animales CAF los que duplican su ingesta en masa diaria promedio respecto a los animales C (Tabla 7). Este cambio no se refleja en la ingesta en masa acumulada, la cual se incrementa de forma similar para ambos grupos a lo largo del tiempo.

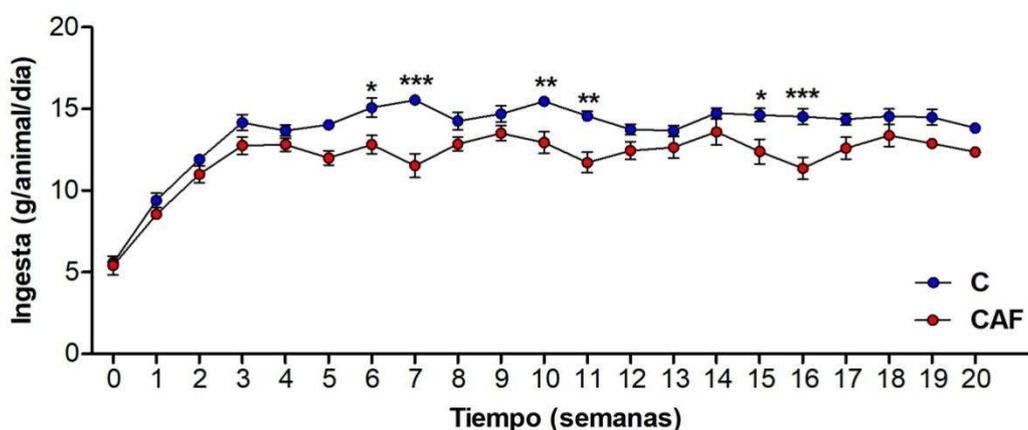


Figura 13. Ingesta semanal en masa de hembras alimentadas con dieta Control (C) o de Cafetería (CAF). Valores expresados como media \pm SEM ($n=32$ /grupo). Se indican con *, **, *** las diferencias significativas entre los grupos C y CAF a $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente mediante análisis ANOVA de medidas repetidas seguido del post test de Bonferroni.

La **ingesta energética** fue calculada en función de la composición energética de cada alimento (Tabla 5) y de la ingesta en masa diaria. La ingesta energética se vio incrementada significativamente desde la segunda semana de dieta, diferencia que se mantuvo prácticamente a

lo largo de toda la intervención dietaria (Figura 14). Cabe destacar que tanto los animales C como CAF mostraron un marcado incremento en la ingesta energética desde el destete hasta la tercer semana de dieta. Los animales CAF presentaron una ingesta energética diaria promedio 21% mayor que los animales C ($p < 0,0001$), la cual se mantuvo a lo largo de todos los períodos de dieta estudiados (Tabla 7). Cabe destacar que, entre las semanas 4 a 11 de dieta, el aumento en la ingesta energética diaria fue similar para ambos grupos dietarios. Sin embargo, en las semanas 11 a 20, el aumento fue casi tres veces mayor para los animales CAF que para los C. Consecuentemente, las hembras alimentadas con CAF por 4 semanas presentaron una ingesta energética acumulada 21% mayor que las C, diferencia que disminuye levemente hacia la semana 11, para volver a incrementarse a un 25% en la semana 20 ($p < 0,001$; Tabla 7).

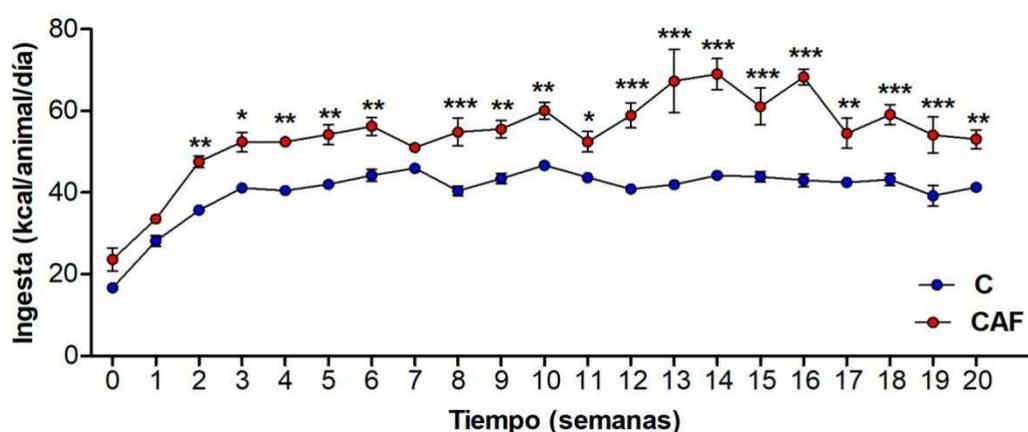


Figura 14. Ingesta semanal en energía de hembras alimentadas con dieta Control (C) o de Cafetería (CAF). Valores expresados como media \pm SEM ($n=32$ /grupo). Se indican con *, **, *** las diferencias significativas entre los grupos C y CAF a $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente mediante análisis ANOVA de dos vías seguido del post test de Bonferroni.

Tabla 7. Ingestas diarias y acumuladas en masa y en energía de hembras alimentadas con dieta control por 4 (C4), 11 (C11) o 20 semanas (C20) o de cafetería por 4 (CAF4), 11 (CAF11) o 20 (CAF20) semanas. Valores expresados como media \pm SEM ($n=10-11$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post test de Tukey; factores: Dieta (D), la duración de la intervención dietaria (t), interacción dieta x duración de la intervención dietaria (Dxt).

	C4	CAF4	C11	CAF11	C20	CAF20	ANOVA
Ingesta diaria promedio (kcal/día)	34,82 \pm 0,66 ^a	42,24 \pm 0,43 ^b	40,35 \pm 0,44 ^b	47,61 \pm 0,54 ^c	41,49 \pm 0,47 ^b	51,08 \pm 1,01 ^d	D, t
Ingesta diaria promedio (g/día)	11,88 \pm 0,22 ^a	10,41 \pm 0,21 ^b	13,61 \pm 0,16 ^c	11,39 \pm 0,16 ^a	13,96 \pm 0,17 ^c	12,05 \pm 0,26 ^a	D, t
Ingesta acumulada (kcal)	452,60 \pm 8,53 ^a	550,00 \pm 5,59 ^b	1331,50 \pm 14,69 ^c	1570,00 \pm 16,61 ^d	2489,60 \pm 28,00 ^e	3110,60 \pm 37,43 ^f	D, t, Dxt
Ingesta acumulada (g)	154,43 \pm 2,87 ^a	135,34 \pm 2,66 ^a	449,01 \pm 5,27 ^b	375,73 \pm 5,44 ^c	837,86 \pm 10,25 ^d	729,90 \pm 9,56 ^e	D, t, Dxt

Una de las características de la dieta CAF es que le permite al animal la libre elección del alimento a consumir [168]. De esta forma la ingesta de los distintos macronutrientes puede verse afectada, por lo que resulta necesario calcularla. La **ingesta de macronutrientes** se expresó como un porcentaje del consumo energético diario total a las 4, 11 o 20 semanas (Figura 15). A lo largo

de todo el estudio, los animales alimentados con CAF presentaron un consumo de energía en forma de lípidos 3 veces mayor a los animales C ($p < 0,0001$), y consumieron menos proteína (-46%; $p < 0,0001$) y carbohidratos (-20%; $p < 0,0001$). Para nuestra sorpresa, a pesar de la gran variabilidad de los ítems que conformaron la dieta CAF, la ingesta de cada macronutriente se mantuvo estable a lo largo de las 20 semanas, primando el consumo de carbohidratos, seguido por las grasas y en último lugar por las proteínas (Figura 15). Sin embargo, la variabilidad de ítems dietarios permitió que, pese a que la dieta ofreció un 46% de energía en forma de grasa y un 8% en forma de proteína, los animales bajo esta dieta sólo consumieron un 33% de energía en forma de grasa y aumentaron al 12% la ingesta de proteína, presumiblemente en un intento de mantener el equilibrio de macronutrientes.

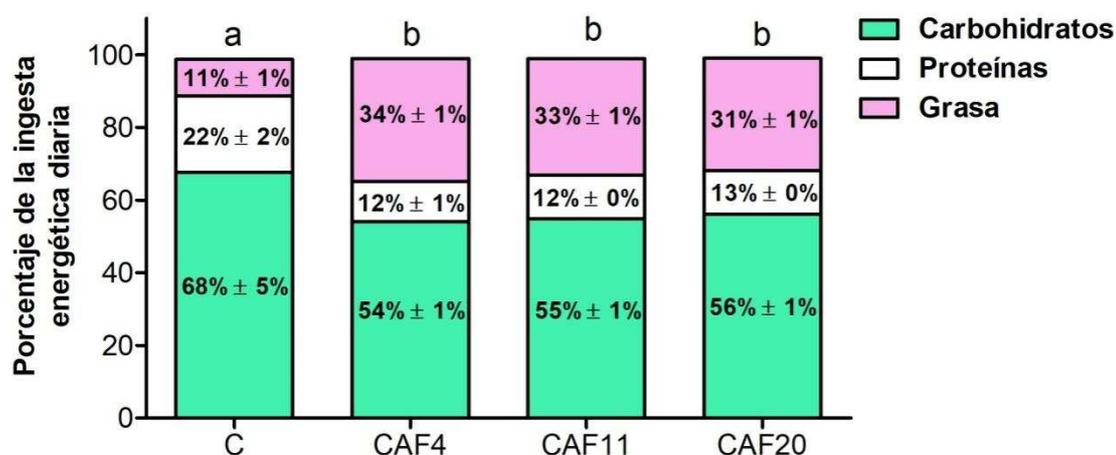


Figura 15. Ingesta en macronutrientes de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería durante 4 (CAF4), 11 (CAF11) o 20 semanas (CAF20). Valores expresados como media \pm SEM ($n=10-11$ /grupo).

Dado que no todos los componentes de la dieta CAF se eligen y consumen por igual, se registró la cantidad exacta de cada alimento consumido [169]. De esta manera, al analizar la **ingesta por tipo de alimentos** (Figura 16), se destaca que a lo largo de toda la intervención dietaria los animales alimentados con CAF prefirieron y consumieron cantidades excesivas de los diferentes alimentos de alta palatabilidad presentados (85% de la ingesta energética diaria total, aproximadamente), en relación al alimento balanceado (15% de la ingesta energética diaria total). Por otro lado, se pudo observar que la ingesta de CAF incrementa la preferencia hacia los alimentos dulces a lo largo del tiempo. La intervención a corto plazo produjo una preferencia del 47% de la ingesta energética acumulada hacia los alimentos dulces (señalizados en verde) sobre los salados (señalizados en amarillo - 36% de la ingesta energética acumulada), mientras que la intervención a mediano plazo incrementó la misma, ya que el 56% de la ingesta energética acumulada de los animales CAF fue de alimentos dulces y un 30% de alimentos salados. Esta preferencia se exagera aún más en el largo plazo, donde el 60% de la ingesta energética acumulada está representada por alimentos dulces y tan sólo el 26% por alimentos salados (Figura 16).

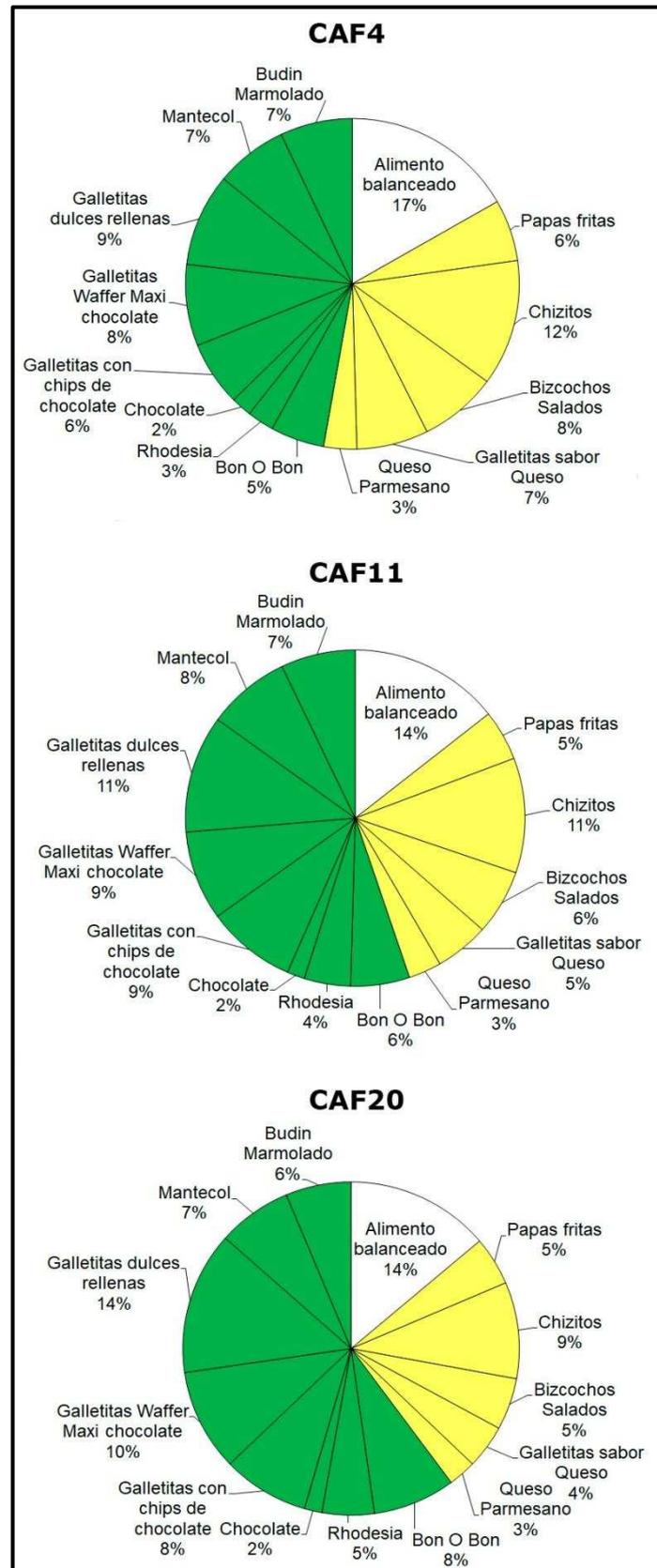


Figura 16. Porcentaje ingerido de cada alimento en relación de la ingesta energética total de hembras alimentadas con dieta de cafetería por (a) 4 (CAF4), (b) 11 (CAF11) o (c) 20 (CAF20) semanas. En verde se muestran los porcentajes de alimentos consumidos dulces - budín marmolado, mantecol, galletitas dulces rellenas (Oreo), Galletitas Waffer Maxi chocolate (Bauducco), Galletitas con chips de chocolate (Toddy), Chocolate, Rhodesia, Bon O Bon – y en amarillo los porcentajes de alimentos consumidos salados – Papas fritas, Chizitos, Biscochos salados (Don Satur), Galletitas sabor queso (Club Social) y Queso parmesano.

4.1.2 Efecto de la dieta CAF sobre el peso corporal.

A partir del seguimiento semanal de los animales se realizó una curva de peso corporal (Figura 17). Los animales de ambos grupos dietarios presentaron un continuo incremento del peso a lo largo de los períodos estudiados. Se observa un menor peso corporal en las hembras alimentadas con dieta CAF hasta la tercera semana de dieta, probablemente debido a la adaptación de los animales a la misma. A las 4 semanas ambos grupos dietarios presentaron el mismo peso corporal (normopeso). A las 4 semanas ambos grupos dietarios presentaron el mismo peso corporal (normopeso). Luego de este punto, los animales alimentados con dieta CAF comenzaron a incrementar su peso corporal en mayor medida que los C, presentando una diferencia significativa de peso a partir de la semana 9 de dieta (sobrepeso), la cual se mantuvo hasta el final de la intervención dietaria, llegando a ser del 16% a las 20 semanas ($p < 0,001$), considerándose un cuadro de obesidad [170]. Esto trajo aparejado una ganancia de peso 15% mayor de las hembras CAF respecto a las C a las 11 semanas de dieta (C: $171,51 \pm 4,13\text{g}$; CAF: $197,43 \pm 3,80\text{g}$; $p < 0,001$) que se incrementó a 19% a la semana 20 (C: $191,97 \pm 3,24$; CAF: $227,6 \pm 5,91\text{g}$; $p < 0,001$).

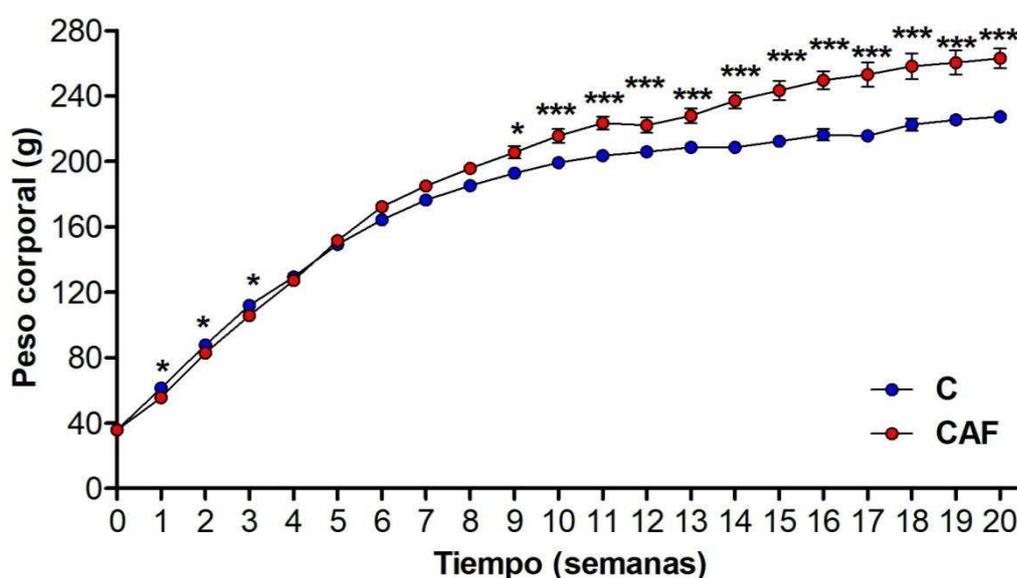


Figura 17. Curva de peso corporal de las hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) durante 20 semanas. Los valores se expresan como la media \pm SEM ($n=32$ animales/grupo hasta las 4 semanas; $n=22$ animales/grupo hasta las 11 semanas y $n=11$ animales/grupo hasta las 20 semanas). Se indican con * las diferencias significativas entre los grupos C y CAF con $p < 0,05$ según test t de Student.

1.1.3 Efecto de la dieta CAF sobre el peso de los parches de tejido adiposo.

Para determinar los posibles cambios sobre el peso de los tejidos adiposos, se aislaron y pesaron los parches de TARP, TAPg y TAS. Los resultados se expresan en gramos (valor absoluto) y como porcentaje respecto del peso corporal total (Tabla 8). A corto plazo, se observó un incremento en el peso del TAS de los animales CAF4 en relación a los C4, tanto en forma absoluta ($p < 0,05$) como relativa al peso del animal ($p < 0,01$). Además, se observó un incremento en el TAPg% ($p < 0,01$). Todas estas diferencias se mantuvieron en el mediano y largo plazo, a las cuales se sumaron un incremento en el peso del TARP como del TAPg de las

hembras CAF, tanto en forma absoluta como relativa al peso del animal ($p < 0,0001$, en todos los casos). Además, la adiposidad se vio afectada de forma diferencial en función de la duración de la intervención dietaria: entre las semanas 4 a la 11, los parches de TAPg y TARP presentaron un marcado aumento tanto en animales alimentados con dieta CAF como C, para luego estabilizarse, a diferencia del TAS, que en ambos grupos dietarios aumentó en mayor medida entre las semanas 11 a 20 ($p < 0,0001$).

Tabla 8. Peso de los tejidos adiposos de hembras alimentadas con dieta control por 4 (C4), 11 (C11) o 20 (C20) semanas o de cafetería por 4 (CAF4), 11 (CAF11) o 20 (CAF20) semanas. Valores expresados como media \pm SEM ($n=10-11$ animales/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey; factores: Dieta (D), duración de la intervención dietaria (t), interacción dieta x duración de la intervención dietaria (Dxt).

Parámetro	C4	CAF4	C11	CAF11	C20	CAF20	ANOVA
TAPg (g)	0,95 \pm 0,10 ^a	3,13 \pm 0,26 ^a	6,93 \pm 0,73 ^b	13,36 \pm 1,24 ^c	7,99 \pm 0,33 ^{b,c}	15,91 \pm 0,92 ^d	D, t, Dxt
TAPg (g/100 g de peso corporal)	0,79 \pm 0,10 ^a	2,59 \pm 0, 19 ^b	3,41 \pm 0,34 ^b	5,92 \pm 0,52 ^c	3,66 \pm 0,11 ^b	6,31 \pm 0,27 ^c	D, t
TARP (g)	0,68 \pm 0,08 ^a	1,20 \pm 0,17 ^a	4,11 \pm 0,48 ^b	6,49 \pm 0,43 ^c	4,95 \pm 0,41 ^{b,c}	9,90 \pm 0,76 ^d	D, t, Dxt
TARP (g/100 g de peso corporal)	0,53 \pm 0, 06 ^a	0,9 \pm 0,11 ^a	2,03 \pm 0,24 ^b	2,88 \pm 0, 18 ^c	2,27 \pm 0,15 ^{b,c}	3,71 \pm 0,22 ^d	D, t, D x t
TAS (g)	0,05 \pm 0,02 ^a	0,33 \pm 0, 06 ^b	0,10 \pm 0, 01 ^{a,b}	0,43 \pm 0, 03 ^c	0,84 \pm 0, 12 ^c	1,38 \pm 0, 25 ^d	D, t
TAS (g /100 g de peso corporal)	0,04 \pm 0,02 ^a	0,23 \pm 0,05 ^b	0,06 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,01 ^b	0,34 \pm 0,05 ^b	0,55 \pm 0, 14 ^c	D, t

1.1.4 Efecto de la dieta CAF sobre parámetros metabólicos y niveles plasmáticos hormonales.

A partir de la sangre troncal obtenida en los sacrificios, se determinó la concentración sérica de metabolitos y hormonas circulantes. Además, se evaluó la resistencia a la insulina de acuerdo al índice HOMA y se determinó la homeostasis de la glucosa mediante el test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. Como puede observarse en la Tabla 9, luego de 11 semanas de dieta las concentraciones séricas de leptina fueron significativamente mayores en las hembras CAF respecto a las C, llegando a ser 3 veces mayores luego de 20 semanas ($p < 0,0001$). Los niveles de glucosa e insulina basales no presentaron cambios con la dieta, lo que, consecuentemente, tampoco se reflejó una variación en el índice HOMA (Tabla 8). Además, 20 semanas de dieta CAF no produjo cambios en la homeostasis de la glucosa, dado que ni el test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (Figura 18) ni el área bajo la curva se vieron afectados por la dieta (Tabla 9). Además, los valores séricos de triglicéridos y colesterol total no presentaron cambios luego de 20 semanas de dieta (Tabla 9). Los niveles séricos de estradiol no se vieron modificados por la dieta, pero sí por la duración de la intervención dietaria, al aumentar luego de 20 semanas de intervención dietaria, tanto en animales C como CAF ($p < 0,01$).

Tabla 9. Parámetros metabólicos de hembras alimentadas con dieta control por 4 (C4), 11 (C11) o 20 (C20) semanas o con dieta de cafetería por 4 (CAF4), 11 (CAF11) o 20 (CAF20) semanas. Valores expresados como media \pm SEM (n=10-11 animales/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey; factores: Dieta (D), duración de la intervención dietaria (t), interacción dieta x duración de la intervención dietaria (Dxt).

Parámetro	C4	CAF4	C11	CAF11	C20	CAF20	ANOVA
Leptina (ng/ml)	1,32 \pm 0,14 ^a	1,73 \pm 0,10 ^{a,b}	1,74 \pm 0,05 ^a	2,53 \pm 0,11 ^b	1,74 \pm 0,28 ^a	5,22 \pm 0,20 ^c	D, t, D x t
Glucosa (mM)	7,82 \pm 0,5	7,14 \pm 0,34	8,21 \pm 0,52	8,36 \pm 0,47	7,37 \pm 0,52	8,11 \pm 0,17	-
Insulina (mU/l)	24,47 \pm 0,98	24,69 \pm 2,37	27,32 \pm 1,28	27,15 \pm 1,03	27,99 \pm 4,20	27,38 \pm 6,33	-
HOMA	8,86 \pm 0,76	7,67 \pm 0,45	10,13 \pm 1,10	10,15 \pm 0,81	9,44 \pm 1,78	10,07 \pm 2,68	-
Área bajo la curva					1410,26 \pm 93,14	1458,54 \pm 118,82	-
Triglicéridos (mmol/l)					102,89 \pm 11,65	82,45 \pm 9,96	-
Colesterol					187,99 \pm 7,89	196,99 \pm 4,82	-
Estradiol (ng/ml)	0,014 \pm 0,002 ^{a,b}	0,008 \pm 0,003 ^{a,b}	0,005 \pm 0,001 ^a	0,011 \pm 0,003 ^{a,b}	0,019 \pm 0,004 ^{b,c}	0,027 \pm 0,003 ^c	T, Dxt

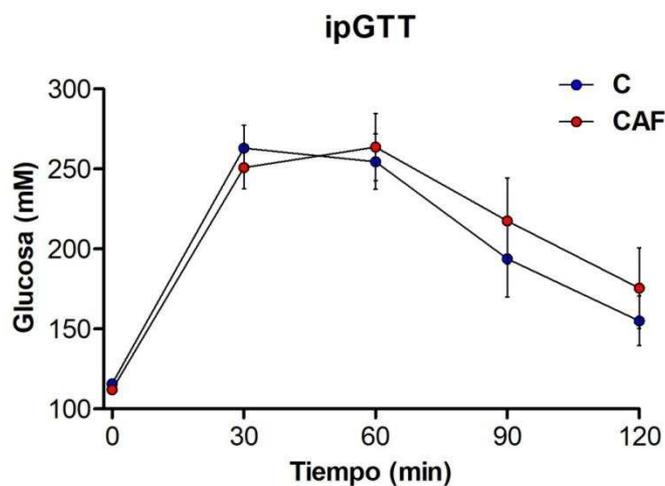


Figura 18. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. Valores expresados como media \pm SEM (n=10-11 animales/grupo).

4.2 EFECTO DE LA DIETA DE CAFETERÍA SOBRE LOS MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DE REGULACIÓN DE LA INGESTA A LO LARGO DEL TIEMPO.

4.2.1 La dieta CAF altera la expresión génica de neuropéptidos en núcleos hipotalámicos discretos.

Con el fin de analizar si la dieta CAF afecta el sistema homeostático de control de la ingesta (Objetivo 2), se estudió la expresión génica de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos en núcleos hipotalámicos discretos, que se muestra en las Figura 19 y 20. En el corto plazo, no se encontraron cambios en la expresión de los genes estudiados en los núcleos hipotalámicos de

interés en los animales CAF4 en relación a los C4. En el mediano y largo plazo, la dieta CAF indujo una señal anorexígena en ARC: 11 semanas de CAF aumentaron significativamente la expresión de *Pomc*, y este efecto se incrementó luego de 20 semanas, cuando los niveles de este neuropéptido se triplicaron ($p < 0,0001$), cambio al cual se suma una disminución a la mitad en la expresión de *Agrp* en CAF20 en relación a C20 ($p < 0,05$; Figura 19a). Tanto la expresión de *Cart* como la de *Npy* no se vieron afectadas por la dieta en este núcleo. En contraste con el perfil neuropeptídico del ARC, la dieta CAF indujo una señal orexígena en PVN, VMN e HL. En PVN, 11 semanas de CAF aumentaron significativamente la expresión de *Npy*, llegando a duplicarse luego de 20 semanas ($p < 0,001$), momento en el cual también se duplicaron los niveles de *Agrp* en este núcleo ($p < 0,01$; Figura 19b). La dieta no generó cambios en la expresión de *Pomc* y *Cart* en este núcleo. En VMN, 11 semanas de CAF duplicaron la expresión de *Agrp* y esta condición se mantuvo luego de 20 semanas de ingesta de CAF ($p < 0,001$), sin observarse cambios en la expresión de *Pomc*, *Cart* ni *Npy* (Figura 19c). Finalmente, en HL, 11 semanas de CAF duplicaron la expresión de *Ox*, cambio que se mantuvo luego de 20 semanas de dieta ($p < 0,01$; Figura 20). Es necesario aclarar que para ambos grupos dietarios la expresión de todos los neuropéptidos medidos fue aproximadamente 16 veces mayor en ARC que en PVN o VMN.

La duración de la intervención dietaria también afectó la expresión de neuropéptidos en los distintos núcleos. En ARC, la expresión de *Agrp* aumentó con el tiempo ($p < 0,01$), mientras que la de *Cart* y *Npy* se redujo tanto en animales alimentados con dieta C como CAF ($p < 0,0001$; Figura 19a). En PVN los niveles de ARNm de *Pomc* ($p < 0,01$), *Cart* ($p < 0,0001$) y *Npy* ($p < 0,0001$) disminuyeron significativamente a partir de la semana 4 en ambos grupos dietarios (Figura 19b). Por último, en VMN, la duración de la intervención dietaria afectó la expresión de *Cart* y de *Npy*, ya que sus niveles de expresión disminuyeron a partir de la semana 4 tanto en animales alimentados con dieta C como CAF ($p < 0,0001$; Figura 19c).

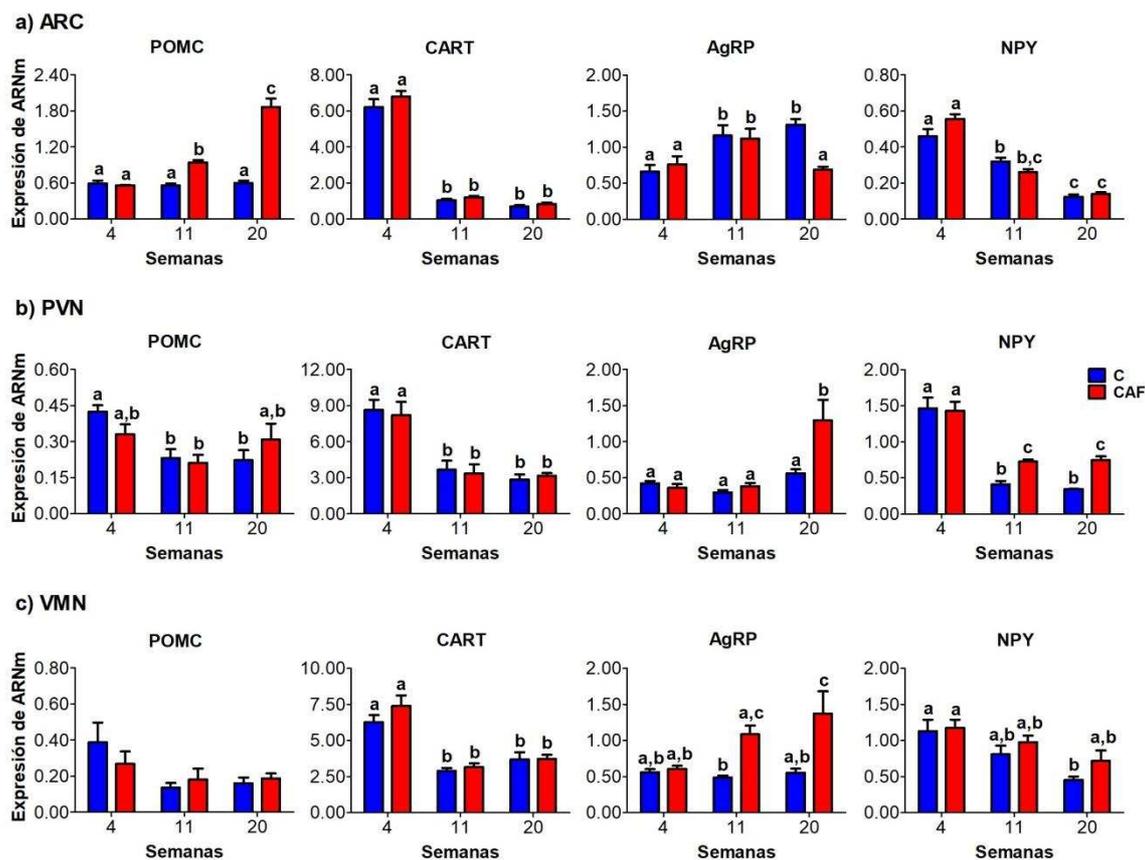


Figura 19. Expresión génica de neuropéptidos *Pomc*, *Cart*, *Agrp* y *Npy* en núcleos hipotalámicos discretos: (A) ARC, (B) PVN, (C) VMN de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) por 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media±SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

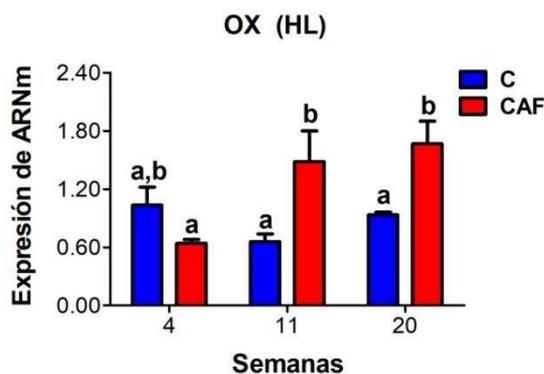


Figura 20. Expresión génica de *Ox* en hipotálamo lateral (HL) de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) por 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media±SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.2.2 La dieta CAF altera la expresión génica de receptores hormonales en núcleos hipotalámicos discretos.

Se evaluó la expresión de *Obrb* y *Rins* en todos los núcleos hipotalámicos aislados y de *GhSR* en ARC e HL (Figura 21). En el corto plazo no se afectó la expresión de ninguno de los receptores estudiados, ya que no se encontraron diferencias en animales CAF4 en comparación a los C4. En el mediano plazo, los animales alimentados con dieta CAF incrementaron significativamente los niveles de expresión de *Obrb* en ARC y este aumento fue aún mayor luego

de 20 semanas de dieta ($p < 0,01$; Figura 21a). No se encontraron cambios en la expresión debido a la dieta en ninguno de los otros núcleos hipotalámicos estudiados.

Por otro lado, la duración de la intervención dietaria afectó los niveles de ARNm de receptores en los distintos núcleos. En ARC se incrementó la expresión de *Rins* luego de 20 semanas de dieta, sólo en CAF20 ($p < 0,0001$), sin generar cambios en *Obrb* o *Ghsr* (Figura 21a). Tanto en PVN como en VMN los niveles de *Obrb* y de *Rins* se vieron disminuidos en la semana 11, independientemente de la dieta administrada ($p < 0,0001$; Figura 21 b y c). En HL, la expresión de *Rins* también disminuyó en la semana 11 ($p < 0,0001$) y la de *Obrb* en la semana 20 ($p < 0,0001$), a diferencia de la de *Ghsr*, que aumentó en la semana 20 para ambos grupos dietarios ($p < 0,001$; Figura 21d).

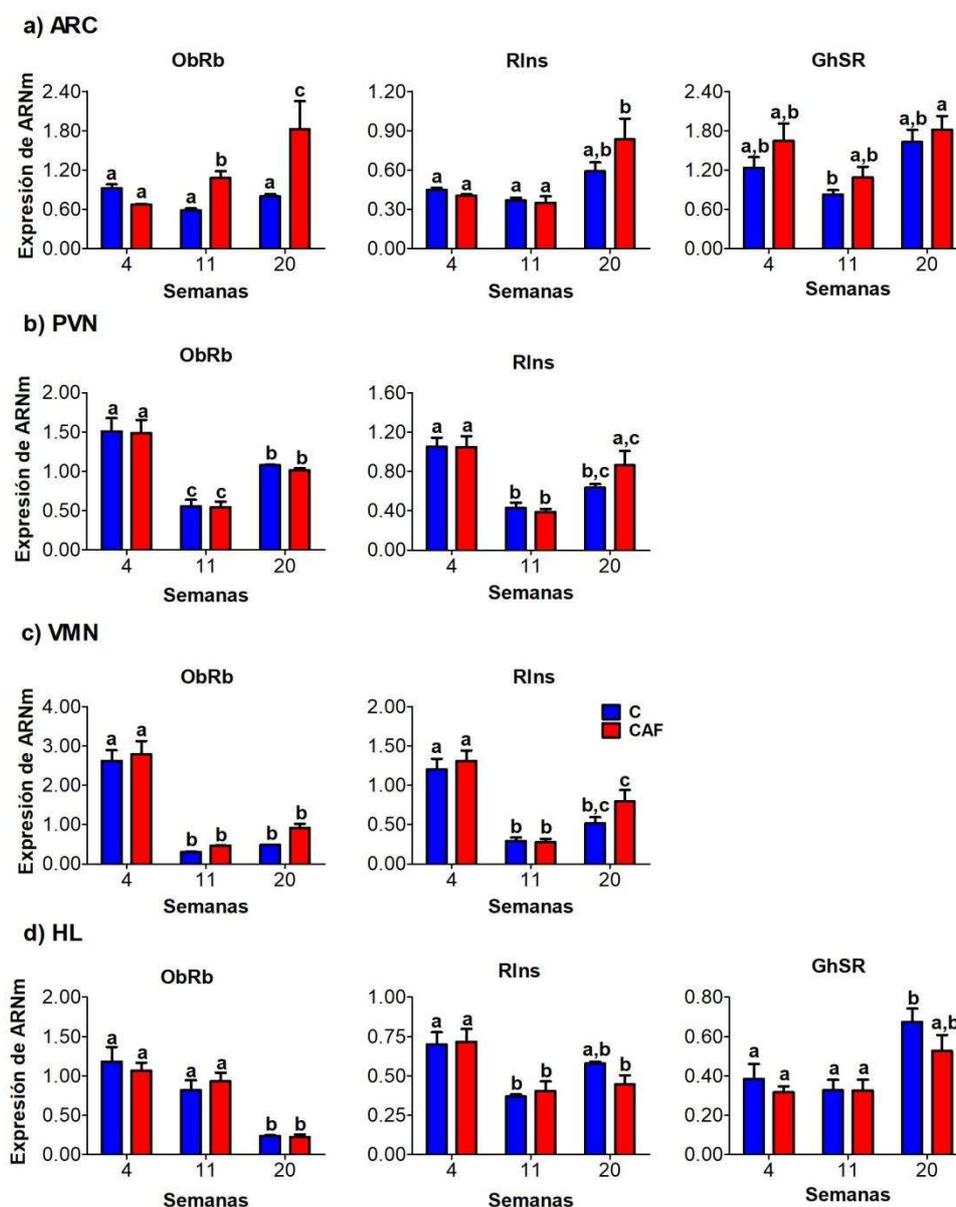


Figura 21. Expresión génica de receptores hormonales *Obrb*, *Rins* y *Ghsr* en núcleos hipotalámicos discretos: (a) ARC, (b) PVN, (c) VMN, (d) HL de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) por 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.2.3 Análisis *in silico* de las regiones reguladoras de los genes correspondientes a los neuropéptidos POMC, AgRP y NPY.

En base a los resultados obtenidos y con el fin de investigar los posibles mecanismos epigenéticos involucrados en los cambios en la expresión de neuropéptidos (Objetivo 5), se analizaron las regiones reguladoras de los genes *Pomc*, *AgRP* y *Npy* y se estudiaron los posibles sitios de unión a factores de transcripción y sitios CpG potencialmente metilables. Los resultados se indican en la Figura 22. Para el gen de *Pomc*, dos regiones diferentes fueron analizadas: el promotor, que ya fue anteriormente descrito [131,171] y dos regiones activadoras transcripcionales, llamadas nPE1 y nPE2. El activador nPE1 es una región de 600 pb situada aproximadamente 12 kb corriente arriba del gen *Pomc* y el activador nPE2 posee 150 pb y se ubica aproximadamente 10 kb corriente arriba del gen. Fue demostrado que ambos activadores intervienen en el control de la expresión hipotalámica del gen *Pomc* [39,172]. En este gen se estudió un sitio de corte de la enzima de restricción sensible a metilación *Mae II* (de ahora en adelante llamado *sitio Mae II*) cercano a la caja TATA (definido como *Mae II* (a)) y un sitio de corte de la enzima de restricción sensible a metilación *BstUI* (de ahora en adelante llamado *sitio BstUI*) situado corriente abajo del promotor (definido como *BstUI* (b)). En el activador nPE1 se analizaron un sitio *Mae II* y uno *BstUI* (*Mae II/BstUI*). El activador nPE2 no contiene ningún sitio CpG, por lo que no pudo ser estudiado (Figura 22a). En el gen *Npy* (Figura 22b), 5 sitios *BstUI* dentro del promotor fueron estudiados, para lo que se utilizaron 3 pares de oligonucleótidos: *BstUI* (a), *BstUI* (b) y *BstUI* (c). La región promotora *AgRP* no contiene ningún sitio CpG en los 1200 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción [39], por lo que el análisis de metilación no pudo ser realizado para este gen.

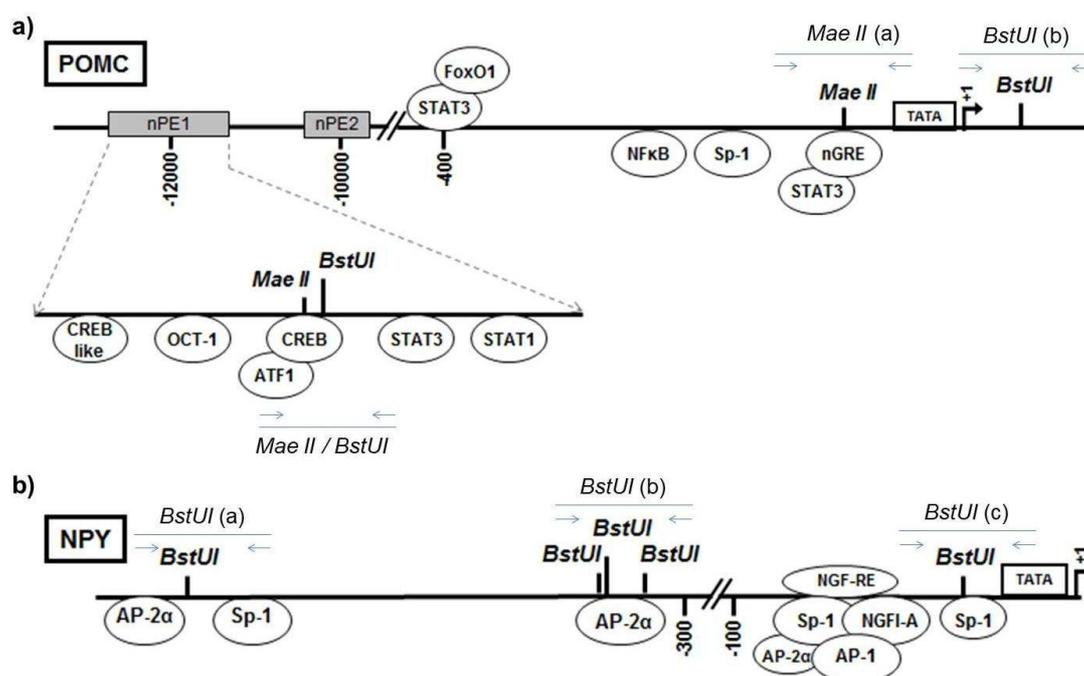


Figura 22. Esquema representativo (a) del promotor y de los activadores (nPE1 and nPE2) del gen de POMC y (b) del promotor de NPY. Se muestran la posición de la TATA box, de los sitios GC target para la

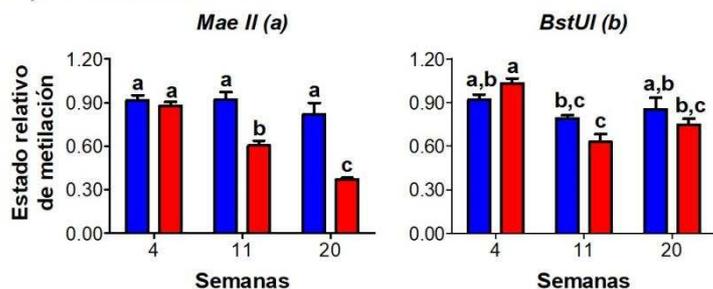
digestión por las enzimas de restricción sensibles a metilación *BstUI* (CGCG) or *Mae II* (ACGT) y los sitios predictivos de unión a factores de transcripción CREB: proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP; OCT-1: factor de unión a octámeros 1; ATF1: Factor de activación transcripcional 1; STAT1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1; STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; FoxO1: del inglés, *Forkhead box O1*; NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; Sp-1: Factor promotor selectivo 1; nGRE: factor de transcripción negativo del elemento sensible a glucocorticoides; AP1: Proteína activadora 1; AP-2a: Proteína activadora 2a; NGF-RE: Factor de crecimiento nervioso RE; NGFI-A: Factor de crecimiento nervioso I-A.

4.2.4 La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones reguladoras de los neuropéptidos POMC y NPY.

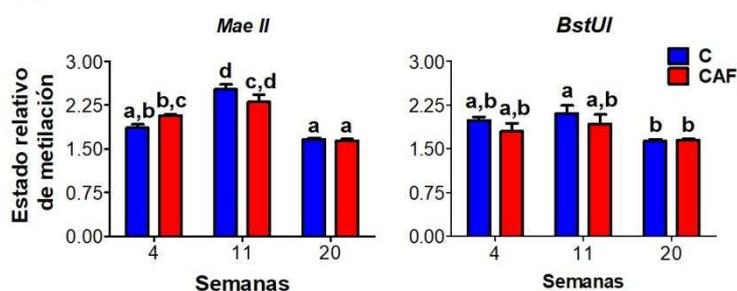
Para determinar si los cambios en la expresión génica *Pomc* en ARC y *Npy* en PVN observados con la dieta CAF se deben a mecanismos de metilación del ADN, las regiones reguladoras de dichos genes fueron evaluadas en los 3 puntos de tiempo en dichos núcleos (Figura 23). En el corto plazo no se encontraron cambios en ninguna de las secuencias regulatorias de los genes estudiados. Para el promotor *Pomc*, se detectó una disminución en el estado de metilación del sitio *Mae II* (a) en ARC de hembras CAF11 en el mediano plazo, cambio que se exacerbó en el largo plazo ($p < 0,0001$; Figura 23a). Sin embargo, no se encontraron modificaciones en el activador *nPEI* (Figura 23b). Por otro lado, en el mediano plazo se observó una disminución en el estado de metilación de los sitios *BstUI* (a) y *BstUI* (b) del promotor del gen de *Npy* en PVN de animales CAF11, cambio que fue más marcado luego de 20 semanas (*BstUI* (a): $p < 0,001$; *BstUI* (b): $p < 0,0001$; Figura 23c).

En ARC, el análisis del activador *nPEI* reveló que la duración de la intervención dietaria afectó de manera diferencial los niveles de metilación del ADN tanto en el sitio *Mae II* ($p < 0,0001$) como *BstUI* ($p < 0,01$) para ambos grupos dietarios (Figura 23b). La duración de la intervención dietaria también afectó los niveles de metilación de los sitios *BstUI* (a) y *BstUI* (b) del gen *Npy* en PVN de animales alimentados tanto con dieta C como CAF ($p < 0,0001$; Figura 23c).

a) Promotor POMC



b) Activador nPE1



c) Promotor NPY

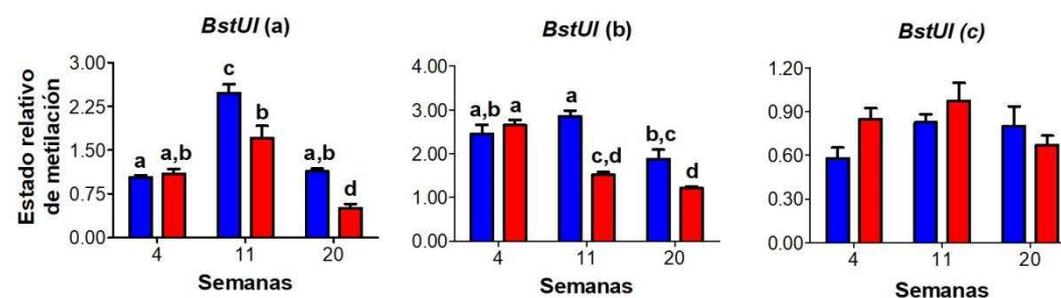


Figura 23. Análisis de metilación de sitios regulatorios de neuropéptidos: (a) promotor de *POMC* y (b) activador nPE1 de *POMC* en ARC y (c) promotor de NPY en PVN de ratas alimentadas con dieta control (C) o de Cafetería (CAF) durante 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3 EFECTO DE LA DIETA DE CAFETERÍA SOBRE LOS MECANISMOS HEDÓNICOS DE REGULACIÓN DE LA INGESTA A LO LARGO DEL TIEMPO.

4.3.1 Efecto de la dieta CAF sobre la expresión de diversos genes en áreas del cerebro pertenecientes al sistema de recompensa.

4.3.1.1 Sistema dopaminérgico.

Dada la importancia que tiene la señalización dopaminérgica en el control de la ingesta, se estudió la expresión de las principales moléculas involucradas en su síntesis, transporte y los correspondientes receptores (Figura 24 – Objetivo 2). En el corto plazo, los animales CAF4 presentaron un aumento en la expresión de *Dat* en ATV ($p < 0,01$; Figura 24a), acompañado por una disminución en los niveles de *Drd2* en NAcSh ($p < 0,05$; Figura 24b) y de *Drd1* en CeA ($p < 0,001$; Figura 24e). En este período de tiempo, en las hembras CAF4 también se observó un

aumento en la expresión de *Drd1* en NAcC ($p < 0,01$; Figura 24c). Estos cambios no se mantuvieron en el tiempo, al no observarse alteraciones dadas por la dieta en la expresión de ninguna de las moléculas estudiadas ni en el mediano ni en el largo plazo.

La duración de la intervención dietaria también afectó la expresión génica. En ATV tanto la expresión de *Drd2* ($p < 0,0001$) como la de *Dat* ($p < 0,0001$) disminuyeron con el tiempo, y la de *Th* disminuyó a las 20 semanas ($p < 0,0001$), en animales alimentados con dieta C y CAF (Figura 24a). En NAcSh, los niveles de ARNm de *Th* ($p < 0,0001$), *Drd2* ($p < 0,0001$) y *Dat* ($p < 0,0001$) disminuyeron a partir de las 4 semanas y los de *Drd1* luego de 20 semanas de dieta (Figura 24b). Además, la duración de la intervención dietaria afectó de manera diferencial la expresión en NAcC, dado que la de *Drd1* disminuyó a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$), a diferencia de la de *Drd2* que aumentó a partir de la semana 4 de dieta ($p < 0,001$), y la de *Dat*, que disminuyó a las 11 semanas, para volver a incrementarse a las 20 semanas de dieta ($p < 0,0001$), tanto en animales C como CAF (Figura 24c). Por su parte, en las dos regiones de la amígdala estudiadas, BLA y CeA, la expresión de *Drd1* ($p < 0,0001$) y *Drd2* ($p < 0,0001$; $p < 0,01$; respectivamente) disminuyó a lo largo del tiempo, para ambos grupos dietarios (Figura 24 d y e).

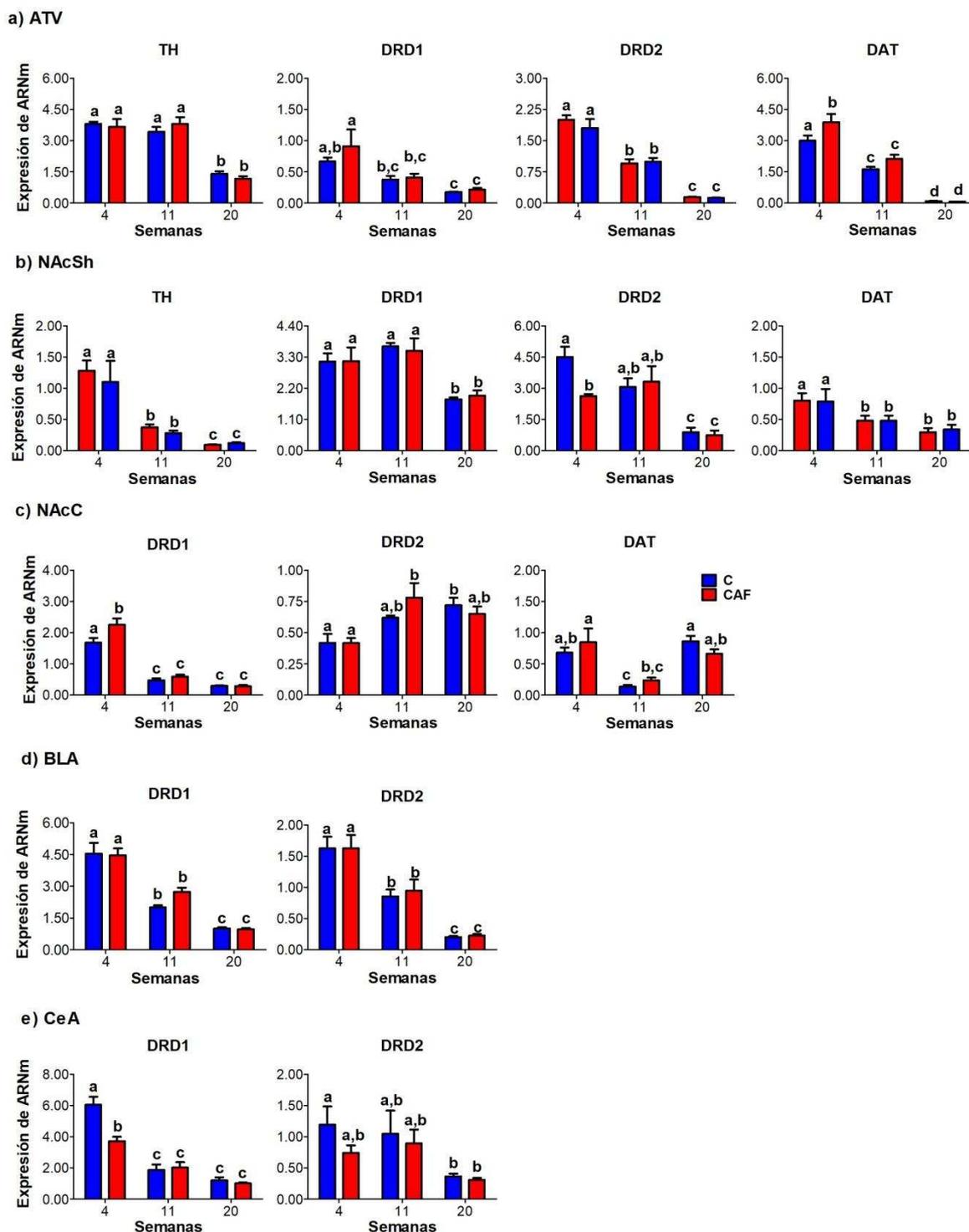


Figura 24. Expresión absoluta de TH, DRD1, DRD2 y DAT en los núcleos (a) ATV, (b) NAcSh, (c) NAcC, (d) BLA y (e) CeA de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) por 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p<0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3.1.2 Sistema GABAérgico.

Siendo GABA el principal neurotransmisor con acción inhibitoria sobre la señalización dopaminérgica, se abordó el estudio de la expresión de las enzimas involucradas en su síntesis (Figura 25). En el corto plazo, se pudo observar una marcada disminución en los niveles de ARNm tanto de *Gad1* como de *Gad2* en ATV ($p < 0,01$; Figura 25a), como así también de *Gad2*

en VP ($p < 0,05$; Figura 25b) de animales alimentados con dieta CAF, sin encontrarse cambios en el mediano y largo plazo.

La expresión de *Gad1* disminuyó con la duración de la intervención dietaria tanto en ATV como en HL ($p < 0,0001$; Figura 25 a y c). En ATV, los niveles de ARNm de *Gad2* también disminuyeron a lo largo de la duración de la intervención dietaria ($p < 0,01$; Figura 25a). Por el contrario, en VP la expresión de *Gad2* aumentó a las 20 semanas de dieta, tanto para los animales alimentados con dieta C como CAF ($p < 0,0001$; Figura 25b).

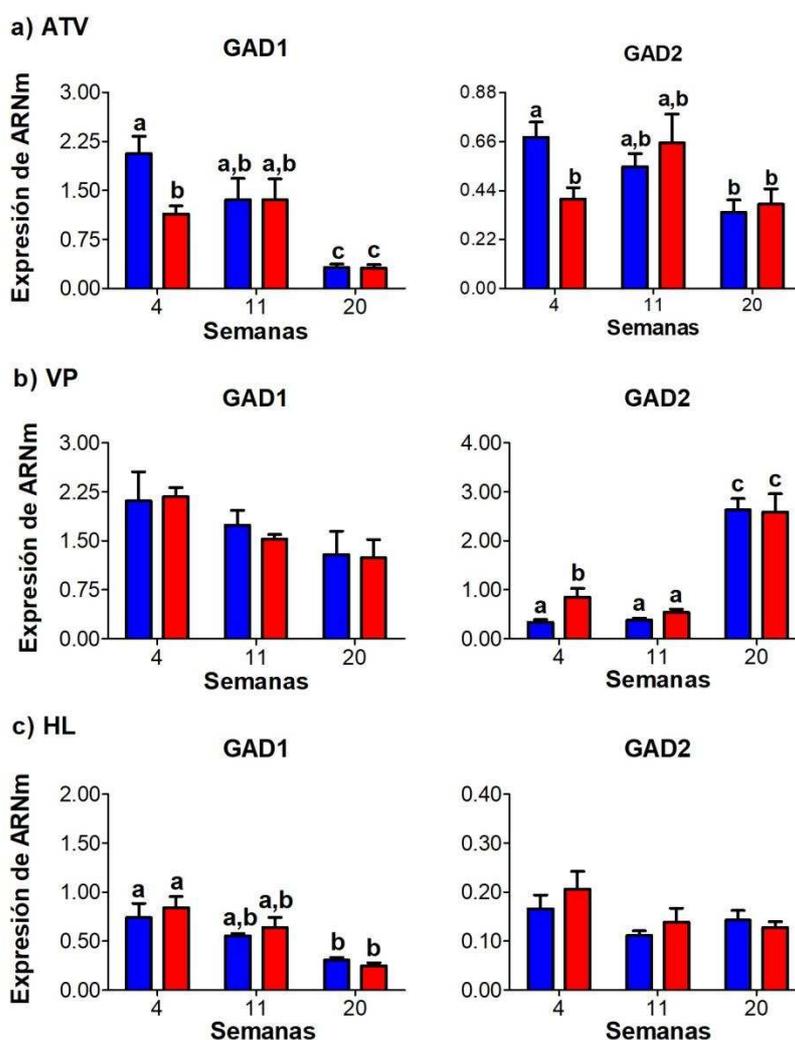


Figura 25. Expresión de GAD1 y GAD2 en los núcleos (a) ATV, (b) VP y (c) HL. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3.1.3 Sistema opioide.

Considerando el rol que tienen los opioides al potenciar la señalización dopaminérgica en diferentes áreas del sistema de recompensa, se estudió la expresión de uno de sus principales receptores: el *Mor* (Figura 26). En el corto plazo, tanto en NAcSh (Figura 26b) como en VP (Figura 26d) se observó una disminución significativa en su expresión por efecto de la dieta CAF ($p < 0,05$), diferencia que se acentuó más en el mediano plazo en NAcSh ($p < 0,05$). Por otra parte, en el mediano plazo también se pudo apreciar un incremento en la expresión de *Mor* del

60% en BLA en animales alimentados con CAF ($p < 0,05$; Figura 26f). No se observaron cambios en la expresión de este gen en el largo plazo entre los grupos C y CAF.

La expresión de *Mor* también se vio afectada por la duración de la intervención dietaria en los núcleos NAcC ($p < 0,001$; Figura 26c), VP ($p < 0,01$; Figura 26d) y BLA ($p < 0,001$; Figura 26f), donde la misma disminuyó a partir de la semana 4 de dieta. Por su parte, en los núcleos NAcSh (Figura 26b), HL (Figura 26e) y CeA (Figura 26g) se observó una disminución en los niveles de ARNm de *Mor* desde la semana 4 a 11 de dieta, para luego volver a aumentar a las 20 semanas ($p < 0,01$; para todos los casos), tanto en los animales alimentados con dieta C como CAF.

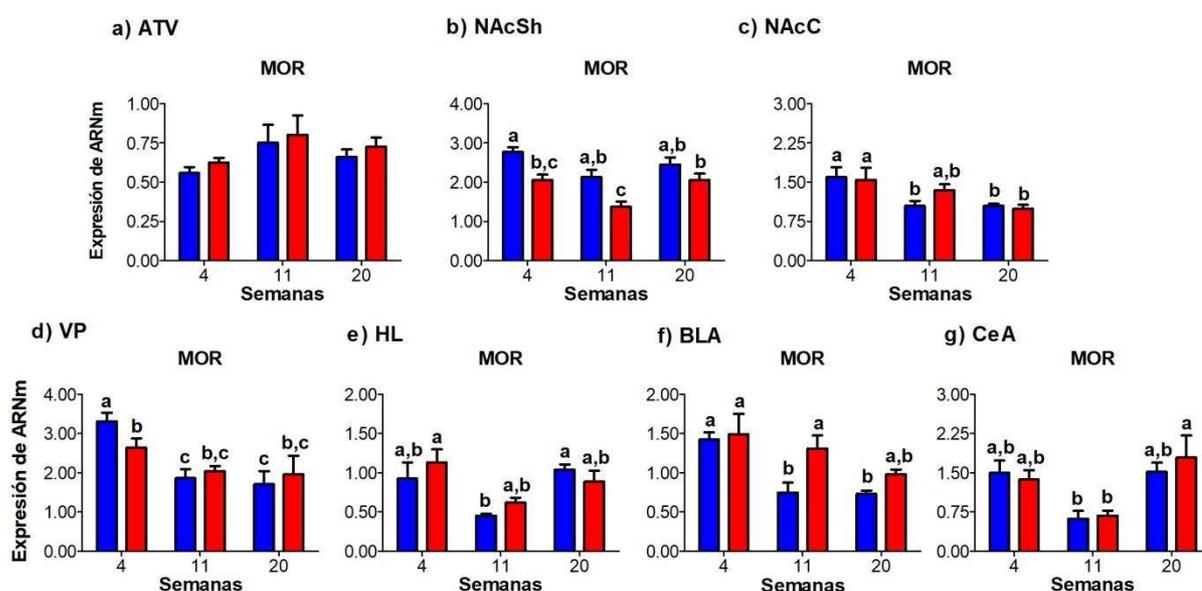


Figura 26. Expresión de MOR en los núcleos (a) ATV, (b) NAcSh, (c) NAcC, (d) VP, (e) HL, (f) BLA y (g) CeA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3.1.4 Sistema de orexinas.

El estudio de la transcripción de *Hcrtr1* y *Hcrtr2* en diferentes núcleos permite relacionar los sistemas homeostático y hedónico, dada la integración de señales que impulsan su producción y sus efectos en las regiones *target* (Figura 27). En el corto plazo, sólo se encontró una disminución en la expresión de *Hcrtr1* en ATV de hembras CAF ($p < 0,05$; Figura 27a). En el mediano plazo tanto los niveles de ARNm de *Hcrtr1* como de *Hcrtr2* disminuyeron en NAcSh ($p < 0,05$; Figura 27b). Esto se revirtió en el largo plazo, en el cual aumentaron significativamente los niveles de *Hcrtr1* tanto en ATV como en VP ($p < 0,01$; Figura 27 a y d).

La duración de la intervención dietaria afectó de forma diferencial la expresión de *Hcrtr1*, ya que en ATV la misma disminuyó a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$; Figura 27a), pero en NAcC (Figura 27c) y VP (Figura 27d) aumentó luego de 20 semanas de dieta ($p < 0,05$; $p < 0,001$; respectivamente). Por otro lado, los niveles de *Hcrtr2* disminuyeron con el tiempo en ATV, NAcC y VP ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,001$; respectivamente - Figura 27 a, c y d).

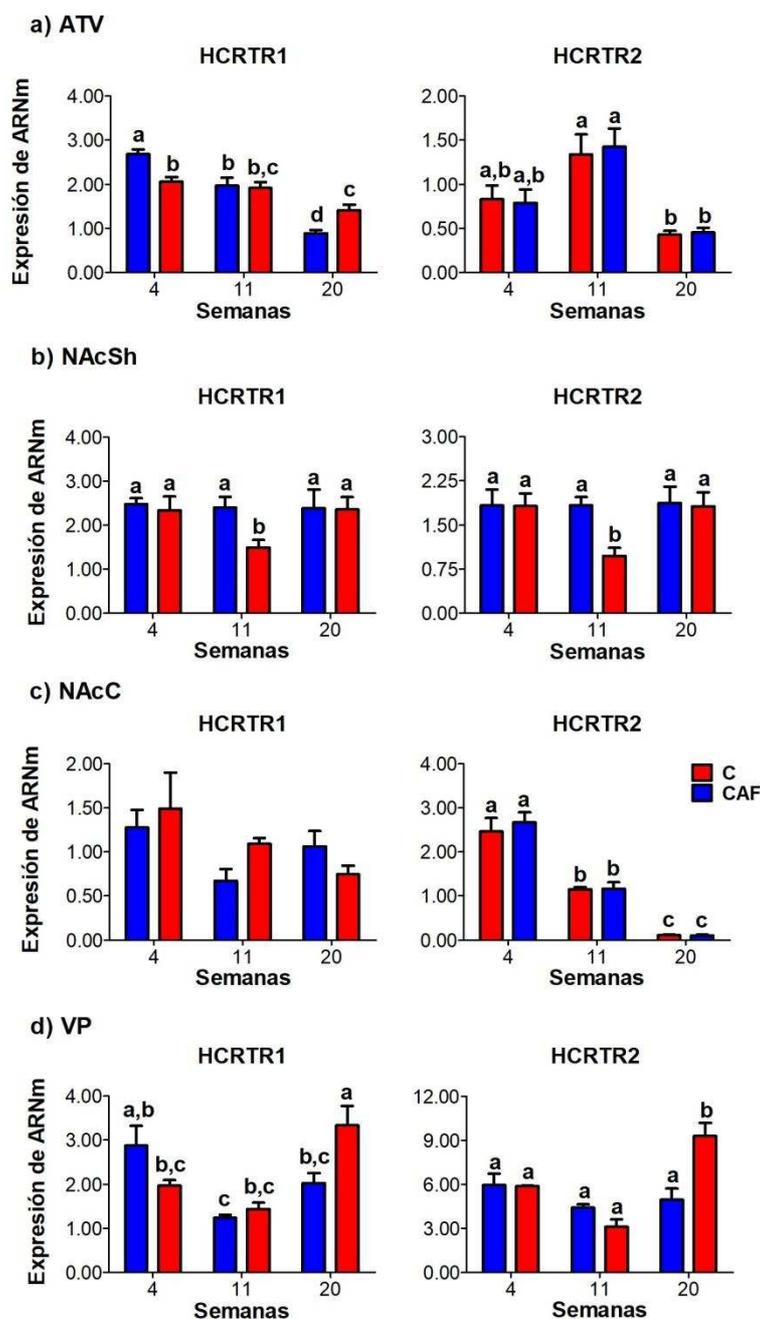


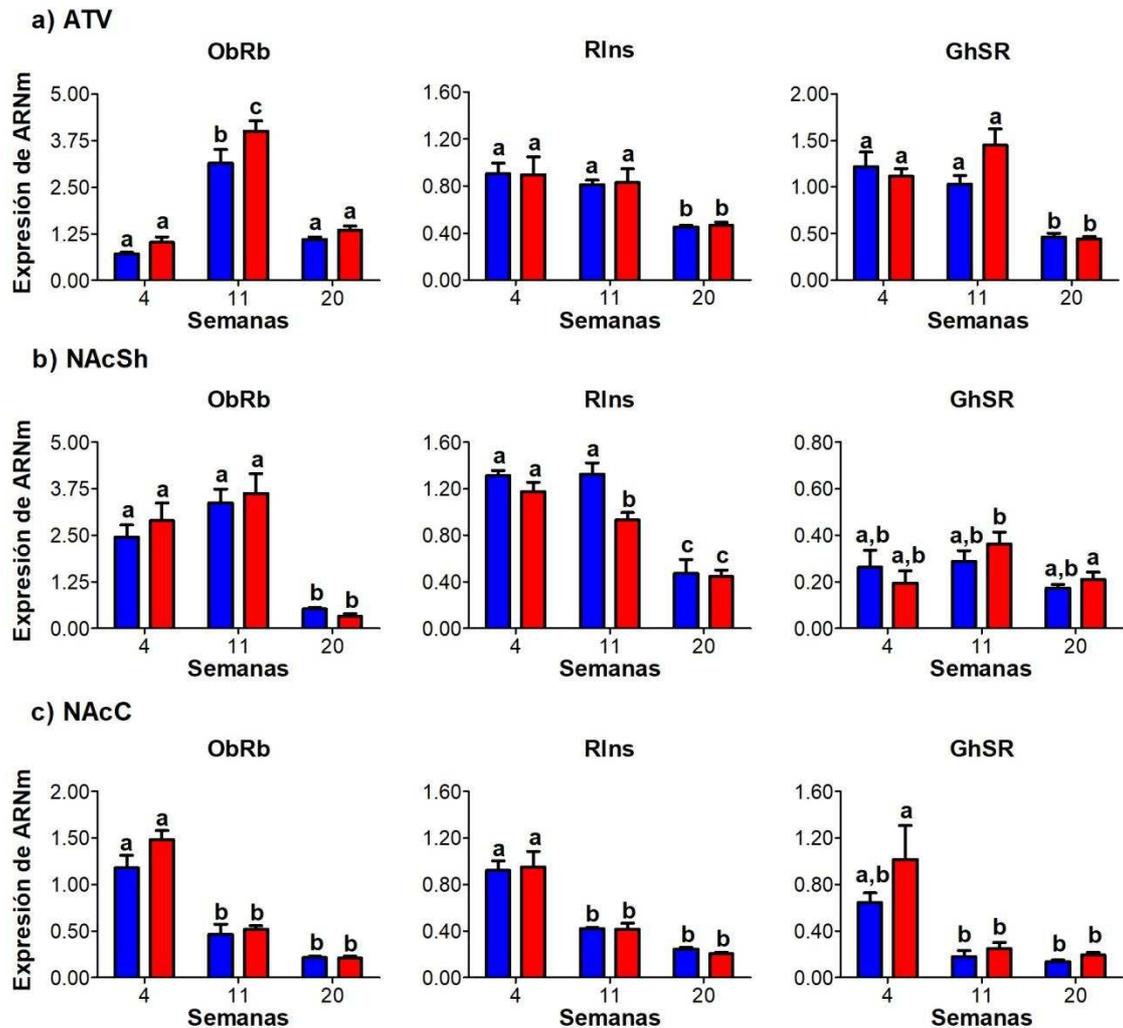
Figura 27. Expresión de HCRTR1 y HCRTR2 en los núcleos (a) ATV, (b) NAcSh, (c) NAcC y (d) VP. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3.1.5 Receptores hormonales.

Considerando que las hormonas reguladoras del metabolismo, la ingesta y el gasto de energía también modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones, se estudió el patrón de expresión de los receptores hormonales en los distintos núcleos del sistema de recompensa cerebral de interés (Figura 28). En el corto plazo, las hembras alimentadas con dieta CAF presentaron en CeA una disminución en la expresión de *Rins* ($p < 0,05$) y de *Ghsr*, que llegó a ser del 50% en el último caso ($p < 0,01$; Figura 28e). En el mediano plazo se encontró una baja en los niveles de ARNm de *Rins* en NAcSh de animales CAF ($p < 0,05$; Figura 28b) y un aumento

en la expresión de *Obrb* en BLA, que se mantuvo luego de 20 semanas de dieta CAF ($p < 0,01$; Figura 28d).

La duración de la intervención dietaria también afectó la expresión de los receptores. En ATV y NAcSh, los niveles de ARNm de los 3 receptores estudiados aumentaron hasta las 11 semanas de dieta y luego disminuyeron a las 20 semanas, tanto para los grupos C como CAF [ATV: *Obrb*, *Rins* y *Ghsr* ($p < 0,0001$; Figura 28a); NAcSh: *Obrb*, *Rins* ($p < 0,0001$) y *Ghsr* ($p < 0,05$; Figura 28b)].



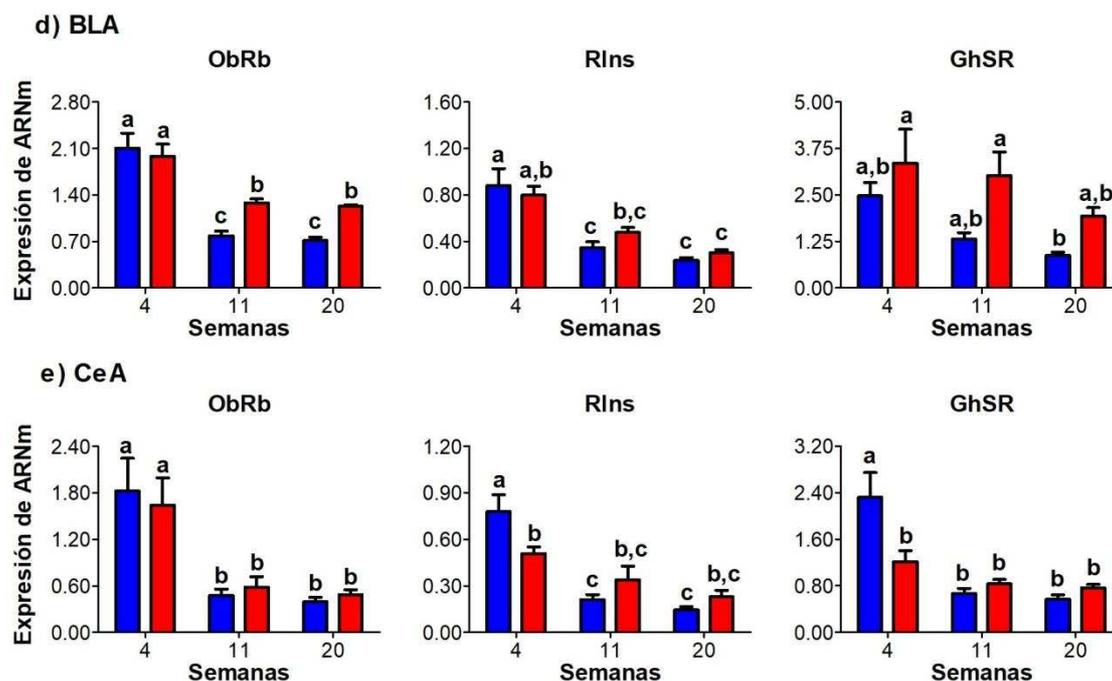


Figura 28. Expresión de ObRb, Rlns y GhSR en los núcleos (a) ATV, (b) NAcSh, (c) NAcC, (d) BLA y (e) CeA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3.2 Análisis *in silico* de las regiones reguladoras de los genes correspondientes a las moléculas del sistema dopaminérgico: TH, DRD1, DRD2 y DAT.

En base a los resultados obtenidos y con el fin de determinar si existe un control epigenético sobre las moléculas de la vía dopaminérgica, se analizaron las regiones reguladoras de los genes correspondientes a *Th*, *Drd1*, *Drd2* y *Dat* de rata y se estudiaron los sitios CpG potencialmente metilables y los posibles sitios de unión a factores de transcripción (Objetivo 5). Los resultados se indican en la Figura 29. Para el gen de *Th* (Figura 29a), 3 sitios *Mae II* pertenecientes a la región promotora fueron estudiados (Definidos como *Mae II* (a), *Mae II* (b) y *Mae II* (c)). En el caso del gen de *Drd1* (Figura 29b), se estudió un sitio *BstUI* (definido como *BstUI* (a)) dentro de la isla CpG ubicada aproximadamente -770 pb del sitio de inicio de la transcripción y una región que fue descrita como promotora, la cual posee aproximadamente 60 pb y está ubicada alrededor de 1700 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, que posee un sitio *Mae II* (definido como *Mae II* (b)) [173]. Respecto al gen de *Drd2* (Figura 29c), fue reportado que su promotor carece de caja TATA o CCAAT y que posee una zona muy rica en nucleótidos GC, que llega a ser del 80% en algunas regiones, reconocido como isla CpG. La misma posee un sitio de iniciación ubicado entre los nucleótidos -6 y +11, un elemento activador ubicado entre los nucleótidos -75 y -30 y dos secuencias con actividad inhibitoria, una ubicada entre -116 y -76 y otra entre los nucleótidos -160 y -135 [174]. Para este gen, se estudiaron 3 sitios *BstUI* ubicados dentro de la isla CpG (definidos como *BstUI*). No se encontraron nucleótidos CG ni en la región activadora ni en ninguna de las dos regiones inhibitorias, por lo que no han podido ser analizadas por esta metodología. Para el gen de *Dat* (Figura 29d), se

estudiaron dos sitios *BstUI* (definidos como *BstUI* (a) y *BstUI* (b)), un sitio *Mae II* (*BstUI* (a) / *Mae II*) y un sitio *SmaI* (*BstUI* (b) / *SmaI*), ubicados dentro de la isla CpG de la región promotora del gen.

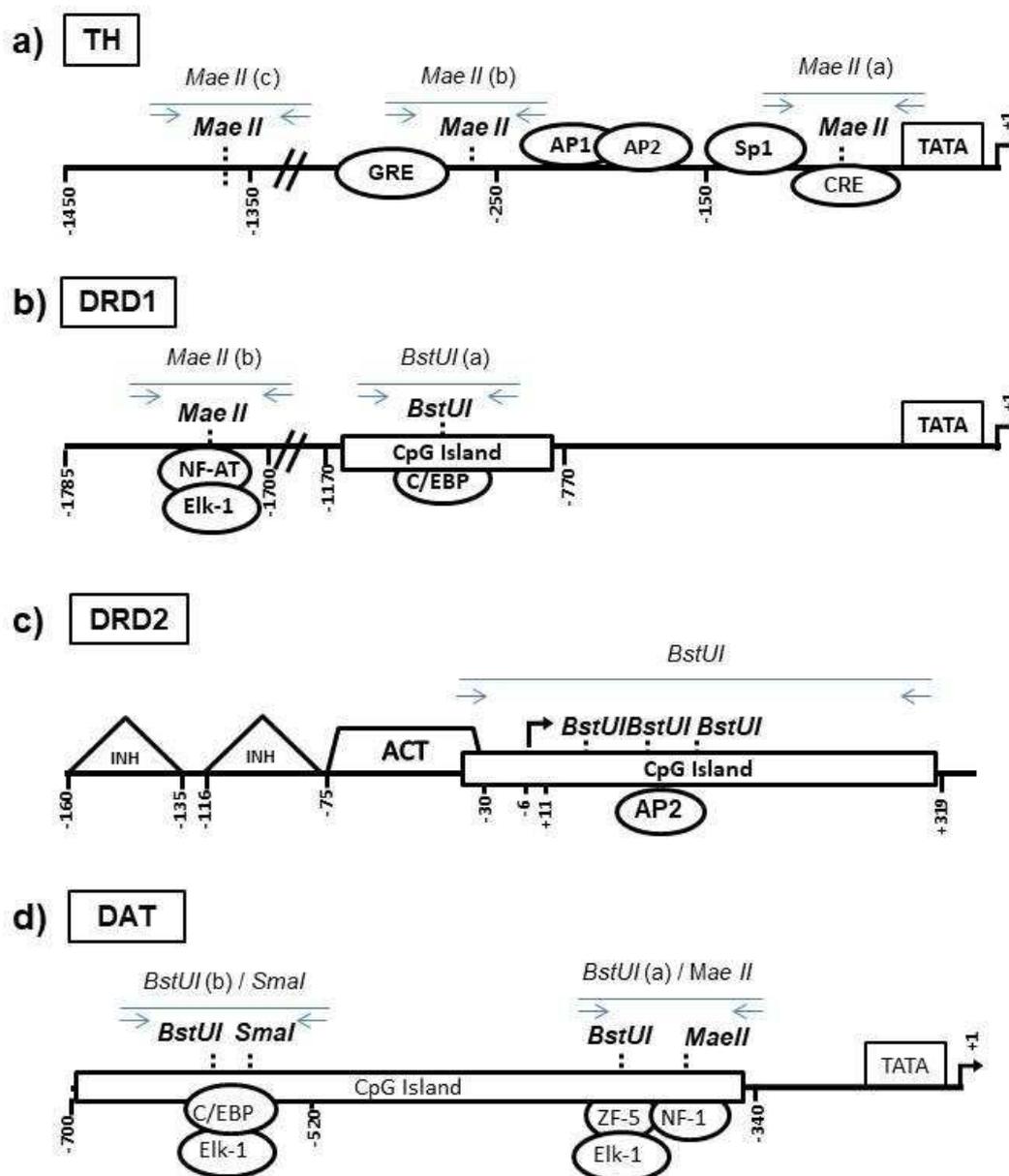


Figura 29. Esquema representativo de los promotores del gen de (a) *Th*, (b) *Drd1*, (c) *Drd2*, (d) *Dat*. Se muestran la posición de la TATA box, de los sitios GC *target* para la digestión por las enzimas de restricción sensibles a metilación *BstUI* (CGCG), *Mae II* (ACGT) o *SmaI* (CCCGGG) y los sitios predictivos de unión a factores de transcripción. ACT: activador; AP: Proteína activadora; C/EBP: CCAAT/proteína de unión al activador; CRE: proteínas de unión a AMPc; CREB: proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP; GRE: Elemento de respuesta a los glucocorticoides; INH: inhibidor; NF-1: factor nuclear 1; NF-AT: factor nuclear de células T activadas; Sp1: Factor promotor selectivo 1.

4.3.3 La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones regulatorias de DAT.

Para determinar si los cambios producidos por la dieta CAF en la expresión de las moléculas de la vía dopaminérgica en las distintas áreas del sistema de recompensa cerebral podrían estar mediados por mecanismos de metilación del ADN (Objetivo 5), las secuencias

promotoras de dichos genes fueron evaluadas (Figura 30). Basados en los cambios observados a nivel transcripcional, decidimos enfocar el estudio epigenético en los animales alimentados por corto y mediano plazo. Por tanto, el análisis fue realizado sobre los promotores de los genes correspondientes a *Th* y *Daten* ATV (Figura 30 a y d), *Drd1* en NAcC (Figura 30b) y *Drd2* en NAcSh (Figura 30c). En el corto plazo se encontró una disminución en el sitio *Mae II* del promotor de *Dat* ($p < 0,05$). En el mediano plazo no se encontraron cambios en ninguna de las regiones regulatorias estudiadas.

La duración de la intervención dietaria sólo afectó los niveles de metilación del sitio *BstUI* (b) del gen *Dat* en ATV de animales alimentados tanto con dieta C como CAF ($p < 0,01$; Figura 30d).

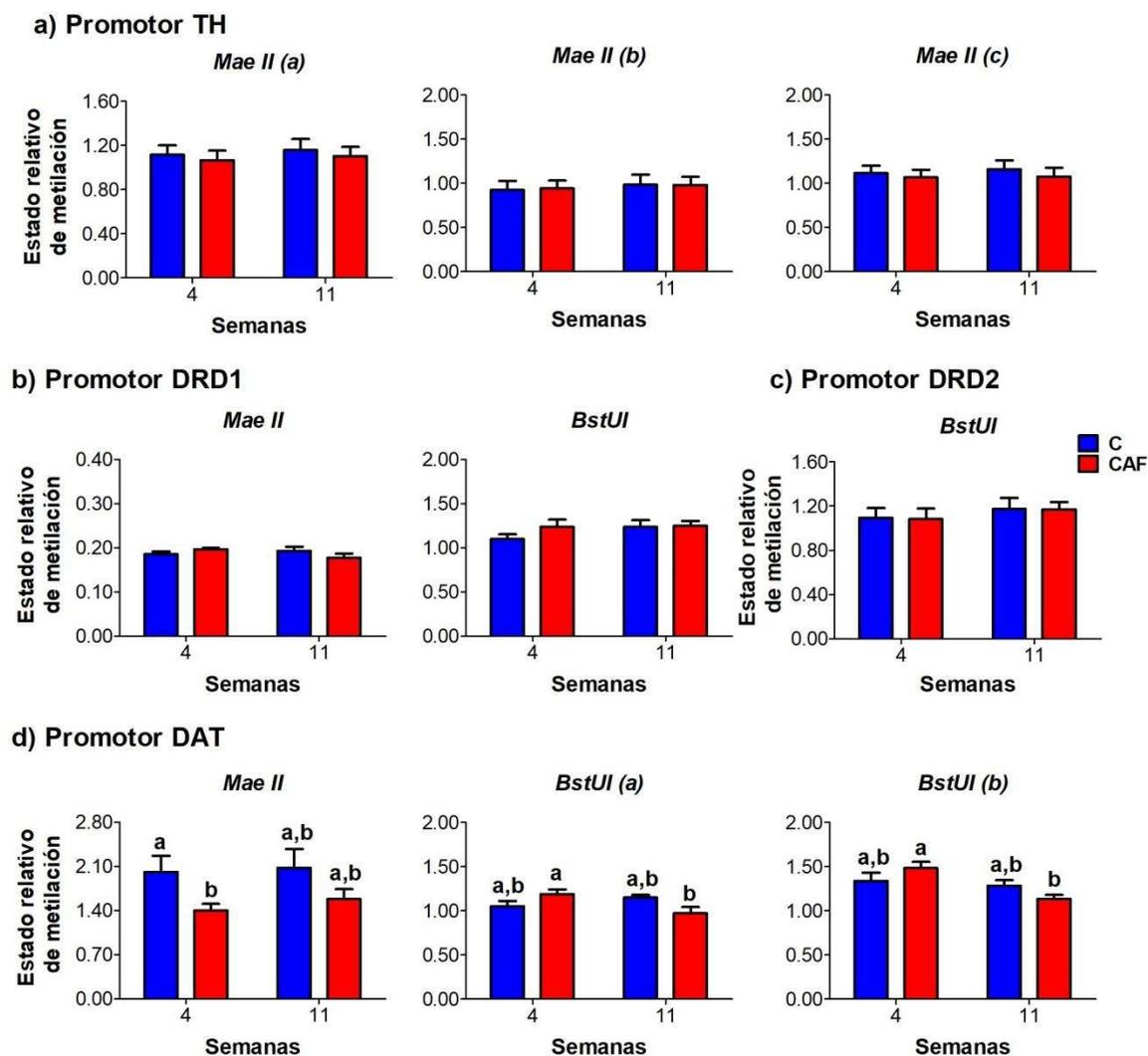


Figura 30. Análisis de metilación de los promotores de los genes de: (A) TH en ATV; (B) DRD1 en NAcC, (C) DRD2 en NAcSh y (D) DAT en ATV de ratas alimentadas con dieta control (C) o de Cafetería (CAF) durante 4 u 11 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.3.4 Efecto de la dieta CAF sobre la saciedad sensorial específica.

Con el fin de evaluar la conducta hacia los alimentos (Objetivo 6), los animales fueron sometidos en el corto y mediano plazo a un test de conducta que evalúa el valor hedónico de los

alimentos. Los dos tiempos de dieta fueron analizados por separado, advirtiéndose a las 4 semanas de dieta un comportamiento diferente al apreciado a las 11 semanas.

Corto plazo

Se pudo apreciar un claro efecto de la dieta CAF sobre la **familiarización**, ya que los animales bajo esta dieta mostraron un consumo de maltodextrina significativamente menor que el de sacarosa ($p < 0,001$, Figura 31a) y sin presentar cambios en el consumo de sacarosa respecto a los animales C. Además, se observó una diferencia significativa en el consumo de solución entre los animales alimentados con dieta C y CAF ($p < 0,001$). Durante la **pre-exposición**, los animales consumieron volúmenes similares de cada solución, sin embargo, nuevamente se observó un menor consumo por parte de los animales alimentados con CAF respecto a los C ($p < 0,01$; Figura 31b), sin presentar efecto entre el consumo de las soluciones. Los resultados del **choice test**, indican que los animales alimentados con dieta CAF consumieron un menor volumen de ambas soluciones con respecto a los animales C ($p < 0,001$; Figura 31c), indistintamente de la solución. Además del consumo de menores cantidades de ambas soluciones, al evaluar la **preferencia** se observó que los animales CAF ingirieron mayor volumen de la solución a la cual no habían sido pre-expuestos con respecto a la solución conocida, indicando preferencia hacia la solución que representa la “novedad” ($p < 0,01$, Figura 31d). Los animales C por su parte, consumieron volúmenes similares de las dos soluciones, no mostrando preferencia hacia ninguna de ellas. Por otra parte, observamos que los animales alimentados con dieta CAF consumieron menor cantidad de la solución a la que habían sido pre-expuestos con respecto a los animales control, lo que demuestra que la dieta CAF afecta el comportamiento hacia la solución conocida. Para evaluar este efecto se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA), que mostró el efecto estadísticamente significativo de la dieta CAF sobre la ingesta de la solución pre-expuesta ($p < 0,01$) que no se observa para la solución no pre-expuesta.

Mediano plazo

Al analizar la **familiarización** a las 11 semanas de dieta se pudo observar un mayor consumo de maltodextrina y un menor consumo de sacarosa en el grupo CAF respecto del C ($p < 0,001$; Figura 31a). Además, se distinguió un efecto de la dieta CAF, ya que estos animales mostraron un consumo de maltodextrina significativamente mayor que el de sacarosa ($p < 0,01$). En la **pre-exposición**, no se observaron diferencias en el comportamiento hacia las soluciones, así como tampoco entre los grupos C y CAF, como se muestra en la Figura 31b. El **choice test**, indicó que no hubo diferencia en los volúmenes consumidos entre los grupos, si bien la dieta CAF tuvo un efecto sobre el consumo de maltodextrina disminuyendo el volumen ingerido respecto del C ($p < 0,01$; Figura 31c). Analizando la **preferencia**, observamos que el grupo C presentó un mayor consumo de la solución a la que había sido pre-expuesto, indicando una preferencia hacia la solución que representa lo “conocido” ($p < 0,01$); mientras que el grupo CAF consideró ambas soluciones como equivalentes (Figura 31d). A través de un ANCOVA se pudo verificar además

que la pre-exposición no generó diferencias en la preferencia entre los grupos C y CAF por las soluciones tanto pre-expuesta como no pre-expuesta.

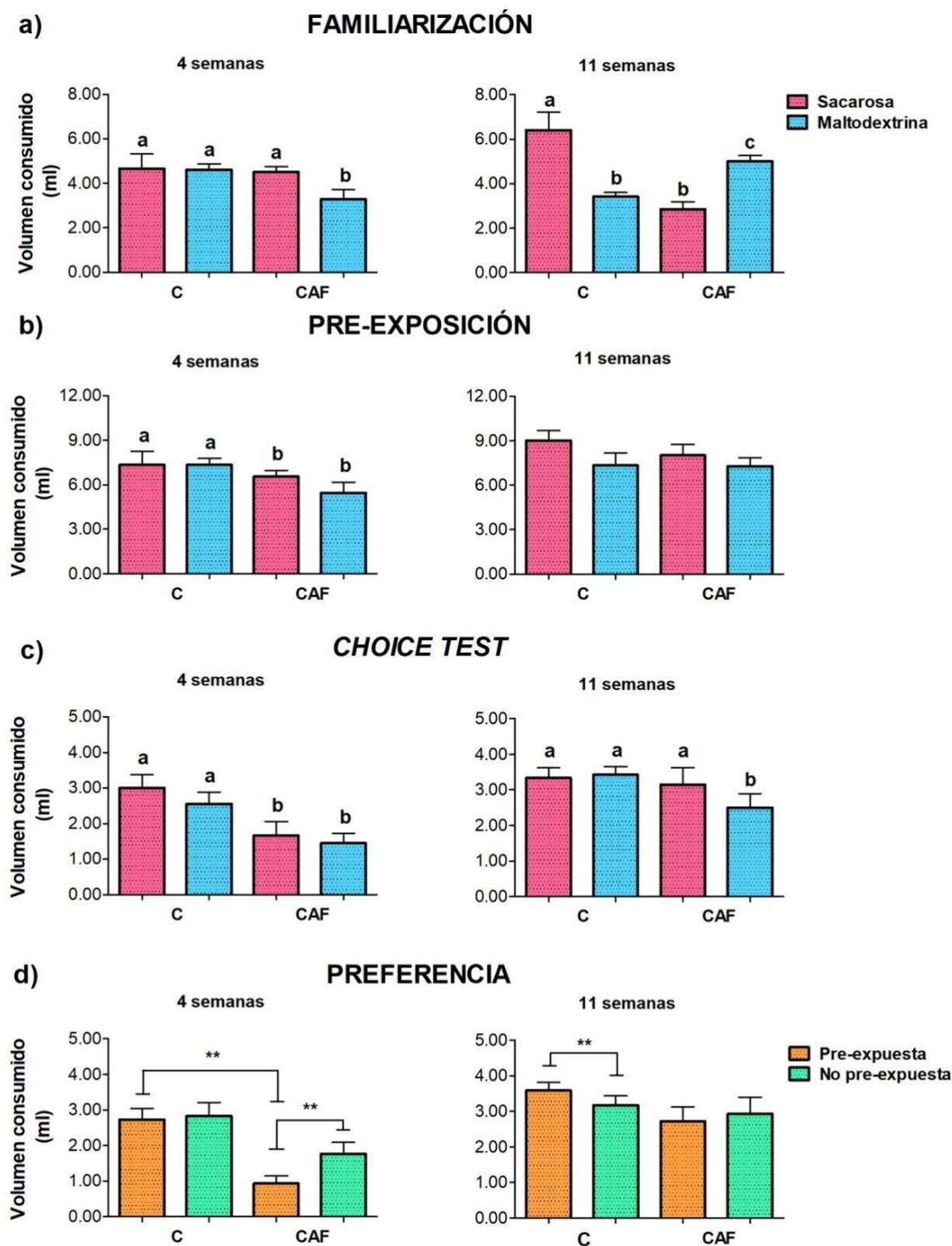


Figura 31. Efecto de la dieta CAF sobre la saciedad sensorial específica. Consumos volumétricos (ml) durante (a) la familiarización, (b) pre-exposición, (c) *choice test* y (d) preferencia en animales sometidos a dieta control (C) o de cafetería (CAF) durante 4 u 11 semanas. Los valores se presentan como el promedio \pm SEM (n=6/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de medidas repetidas (a y c) y ANOVA para muestras dependientes (b). La preferencia dentro de cada grupo se analizó por una prueba t para muestras relacionadas, y el efecto de la pre-exposición entre los grupos por ANCOVA (d); ** $p < 0,01$.

4.3.5 Efecto de la dieta CAF sobre la locomoción y la interacción social.

Tanto en el corto, mediano y en el largo plazo la dieta CAF incrementó la cantidad de veces que el animal se irguió en dos patas en el test de locomoción ($p < 0,01$; Figura 32b), lo cual indicaría una mayor conducta exploratoria por parte de los animales CAF respecto a los C. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los parámetros tiempo en centro del campo y frecuencia con la que el animal cruzó líneas en los animales CAF (Figura 32 a y c), indicando que la actividad locomotora y ansiedad se encontrarían intactas.

Cuatro semanas de dieta CAF aumentaron la frecuencia de evasión en el test de interacción social respecto a los animales C ($p < 0,01$; Figura 33a), que luego se normalizó a las 11 y 20 semanas de dieta. Al analizar el seguimiento y la exploración social no se encontraron diferencias entre los animales de dietas C y CAF en los tiempos estudiados (Figura 33 b y c). Tanto la evasión como el seguimiento disminuyeron con la duración de la intervención dietaria tanto en animales C como CAF (evasión: $p < 0,0001$; seguimiento: $p < 0,05$).

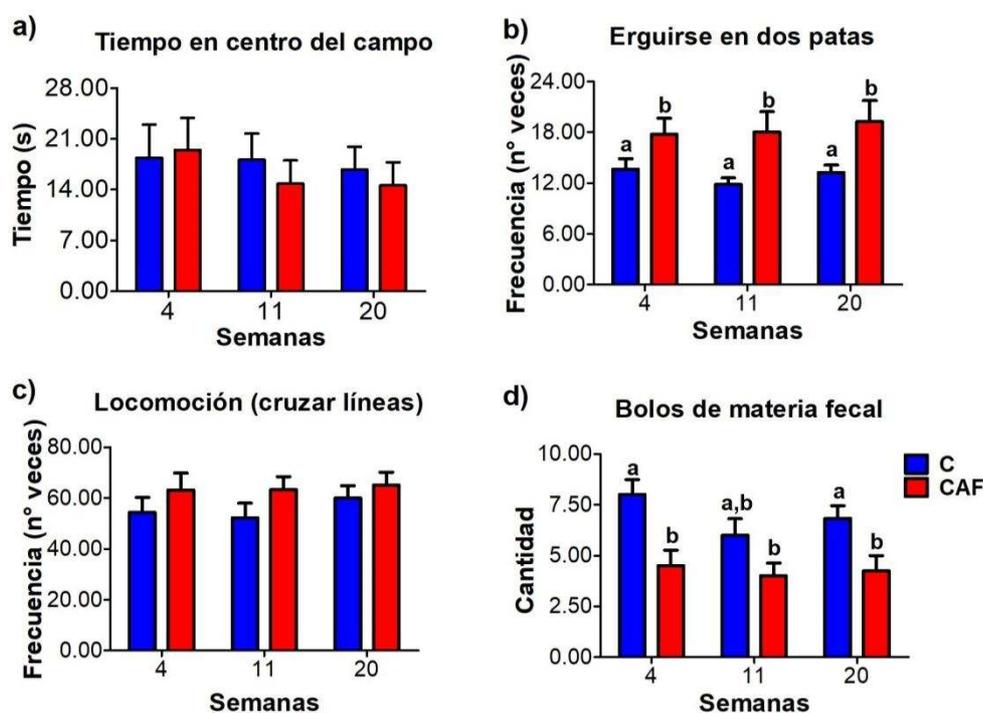


Figura 32. Test de locomoción: (a) Tiempo en centro del campo abierto; (b) Frecuencia con la que el animal se paró en dos patas y (c) Frecuencia con la que el animal cruzó líneas y (d) Cantidad de bolos de materia fecal en el campo abierto. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de medidas repetidas seguido de post-test de Bonferroni.

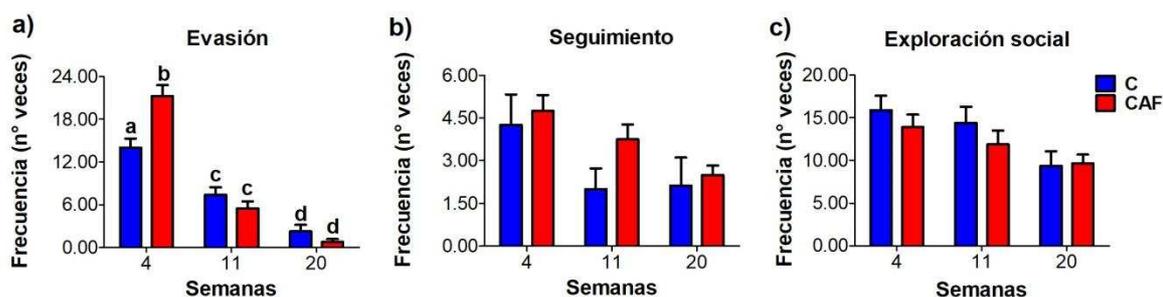


Figura 33. Test de interacción social: (a) Frecuencia de evasión del animal al compañero; (b) Frecuencia con la que el animal persiguió al compañero y (c) Frecuencia con la que el animal exploró al compañero. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de medidas repetidas seguido de post-test de Bonferroni.

4.4 EFECTO DE LA DIETA CAF SOBRE LA VÍA NEUROESTEROIDOGÉNICA EN EL HIPOTÁLAMO.

4.4.1 La dieta CAF produce cambios en la expresión génica de enzimas neuroesteroidogénicas en PVN y VMN.

Puesto que ha sido reportada una relación cercana entre los esteroides y la ingesta energética, se estudió si la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas en los distintos núcleos hipotalámicos de interés se ve alterada por la dieta CAF a lo largo del tiempo (Figura 34 – Objetivo 3). En el corto plazo sólo se encontró una disminución en la expresión de $5\alpha-r$ en ARC de animales CAF4 ($p < 0,001$; Figura 34a). En el mediano plazo, la expresión de $5\alpha-r$ en PVN disminuyó al 50% ($p < 0,001$; Figura 34b) y la de *Aro* se duplicó en VMN ($p < 0,01$; Figura 34c) de animales alimentados con dieta CAF. Estos cambios se sostuvieron en el largo plazo, momento en el cual también se duplicó la expresión de *Aro* en PVN ($p < 0,01$; Figura 34b) y de $3\alpha-hsd$ ($p < 0,001$) y $3\beta-hsd$ ($p < 0,01$) en VMN de animales CAF20 (Figura 34c).

La duración de la intervención dietaria también afectó la expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas. En ARC, la expresión de $3\beta-hsd$ ($p < 0,0001$) disminuyó con el tiempo, mientras que la de *Aro* ($p < 0,001$) aumentó luego de 20 semanas de dieta tanto en animales C como CAF (Figura 34a). Por su parte, los niveles de ARNm de *Star* y $5\alpha-r$ ($p < 0,0001$) disminuyeron a las 11 semanas, pero volvieron a aumentar luego de 20 semanas (Figura 34a). En PVN, la expresión tanto de $3\beta-hsd$ como de $5\alpha-r$ ($p < 0,0001$) disminuyó a partir de la semana 4 de dieta, en ambos grupos dietarios y los niveles de *Star* y $3\alpha-hsd$ ($p < 0,0001$) disminuyeron a las 11 y aumentaron a las 20 semanas de dieta (Figura 34b). Por último, en VMN, la duración de la intervención dietaria afectó la expresión de $3\alpha-hsd$ y *Aro* ($p < 0,0001$), ya que la misma disminuyó a partir de la semana 4, a diferencia de la de *Star* y $5\alpha-r$ ($p < 0,0001$), que aumentó luego de 20 semanas de dieta, en hembras C y CAF (Figura 34c).

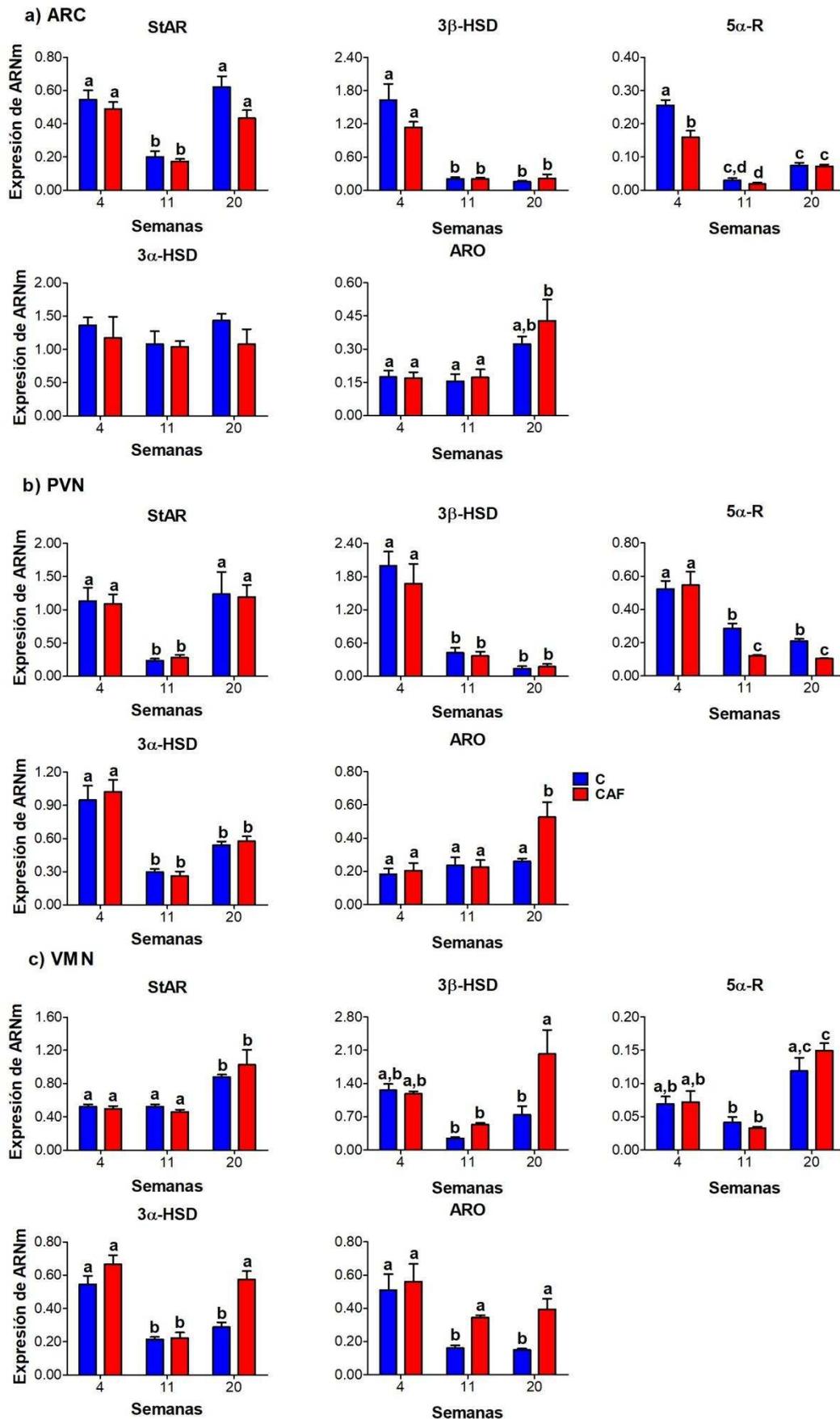


Figura 34. Expresión génica de enzimas neuroesteroidogénicas en núcleos hipotalámicos discretos: (a) ARC; (b) PVN; (c) VMN de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) por 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media±SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.4.2 La dieta CAF altera la expresión de receptores de hormonas esteroides.

Teniendo en cuenta el rol de las hormonas esteroides en el control de la ingesta, se estudiaron los posibles cambios inducidos por la dieta CAF en la expresión de sus receptores, en los distintos núcleos hipotalámicos (Figura 35). En el corto plazo, en ARC se encontró un aumento en la expresión tanto de $Re\alpha$ ($p < 0,01$) como de Rp ($p < 0,01$) de animales CAF4 (Figura 35a). En el mediano plazo no se observaron cambios de expresión en ninguno de los receptores. Por último, en el largo plazo en ARC se pudo apreciar un aumento en la expresión de $Re\alpha$ ($p < 0,05$) y de RP ($p < 0,01$; Figura 35a).

La duración de la intervención dietaria también afectó la expresión de los receptores. La expresión de $Re\alpha$ disminuyó con el tiempo en los 3 núcleos estudiados, tanto para animales alimentados con dieta C como CAF ($p < 0,0001$). Por su parte, los niveles de ARNm de Rp aumentaron luego de 20 semanas en ARC ($p < 0,0001$; Figura 35a), pero disminuyeron con el tiempo en PVN y VMN ($p < 0,0001$; Figura 35 b y c).

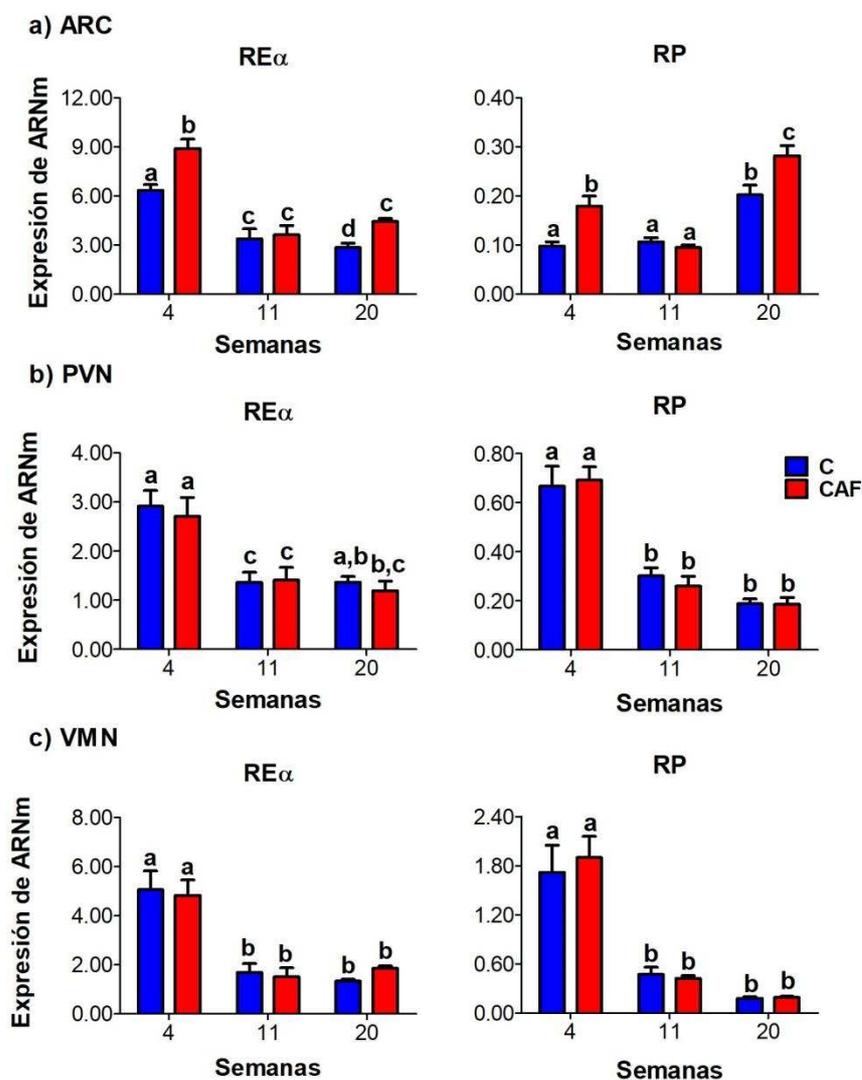


Figura 35. Expresión génica de receptores hormonales RE α y RP en núcleos hipotalámicos discretos: (a) ARC, (b) PVN y (c) VMN de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetaía (CAF) por 4, 11 o 20 semanas. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.4.3 La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones regulatorias de enzimas neuroesteroidogénicas en PVN, pero no en VMN.

Para analizar si los cambios en la expresión génica de las enzimas neuroesteroidogénicas observados en animales alimentados con dieta CAF se deben a mecanismos de metilación del ADN, las secuencias regulatorias de los genes de *5 α -r*, *Aro* y *3 α -hsd* fueron evaluadas en los núcleos hipotalámicos PVN y VMN (Figura 36). En el corto plazo, no se observaron cambios en el estado de metilación de ninguna de las regiones estudiadas. Por su parte, en el mediano plazo se pudo apreciar un aumento en el estado de metilación de los sitios *BstUI* (a) ($p < 0,001$) y *Mae II* (d) ($p < 0,01$) del promotor de *5 α -r* en PVN de hembras CAF (Figura 36b). Para el promotor de *Aro*, se detectó una disminución en el estado de metilación del sitio *Mae II* ($p < 0,05$) en PVN de animales CAF (Figura 36d). Todos estos cambios se mantienen en el largo plazo, sumado a un incremento en los niveles de metilación del sitio *Mae II* (c) ($p < 0,05$) del promotor de *5 α -r* en PVN de CAF20 (Figura 36b). Por el contrario, en VMN no se detectaron cambios por dieta en el estado de metilación de ninguno de los sitios de los promotores de *Aro* o *3 α -hsd* estudiados (Figura 36 e y g).

La duración de la intervención dietaria no afectó a los niveles relativos de metilación de ninguno de los promotores de los genes de las enzimas neuroesteroidogénicas estudiados.

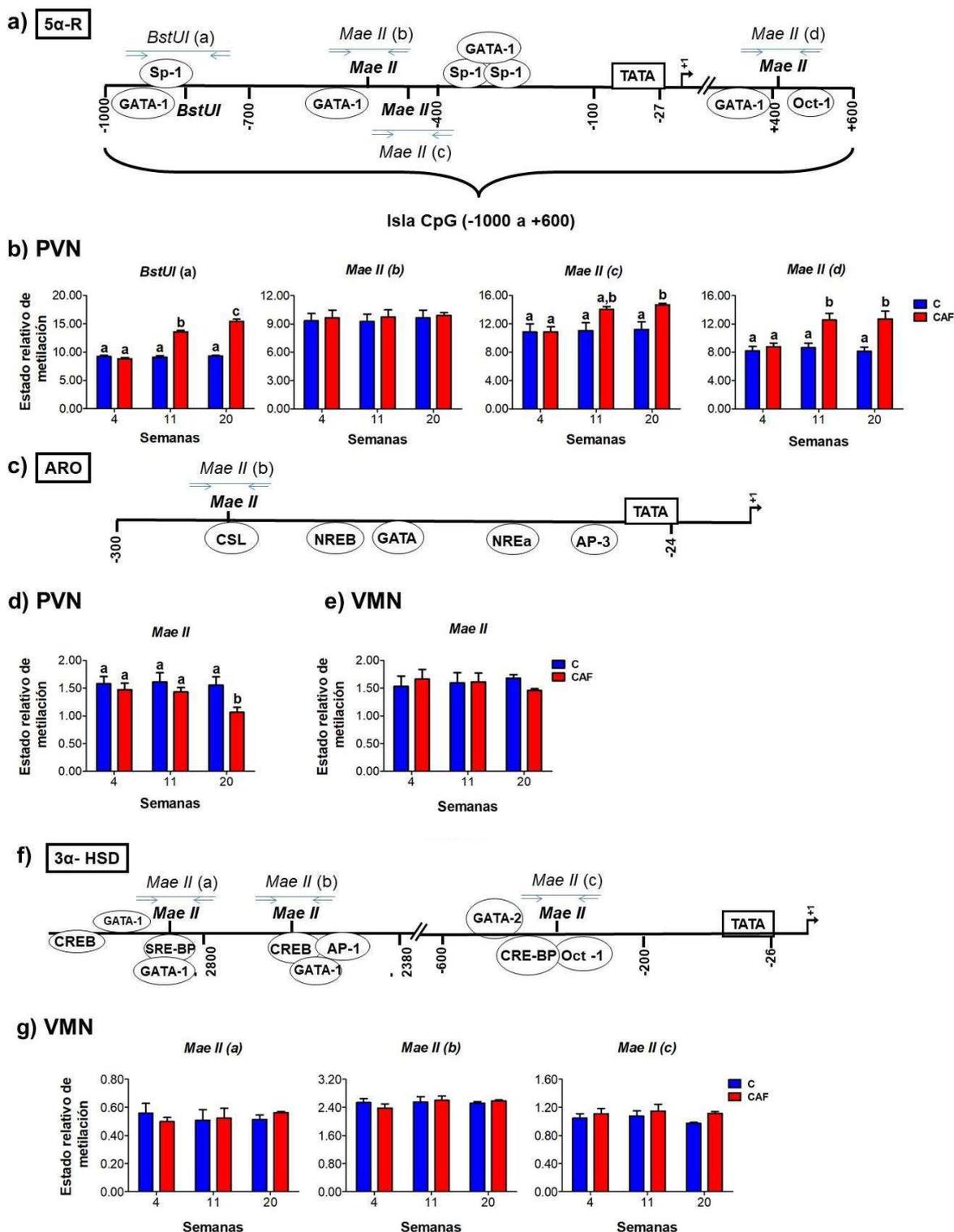


Figura 36. Esquema representativo de los promotores del gen de (a) 5 α -R, (c) ARO, (f) 3 α -HSD y análisis de metilación de sitios regulatorios de las enzimas neuroesteroidogénicas: (b) 5 α -R en PVN, (d) ARO en PVN y (e) VMN y (g) 3 α -HSD en VMN de ratas alimentadas con dieta control (C) o de Cafetería (CAF) durante 4, 11 o 20 semanas. Se muestran la posición de la TATA box, de los sitios GC *target* para la digestión por las enzimas de restricción sensibles a metilación *BstUI* (CGCG) y *Mae II* (ACGT) y los sitios predictivos de unión a factores de transcripción. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey. Sp1: Factor promotor selectivo 1; GATA-1: Proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides 1; OCT-1: Factor de unión a octámeros 1; CREB: proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP; SREBP-: Proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides. También se indican

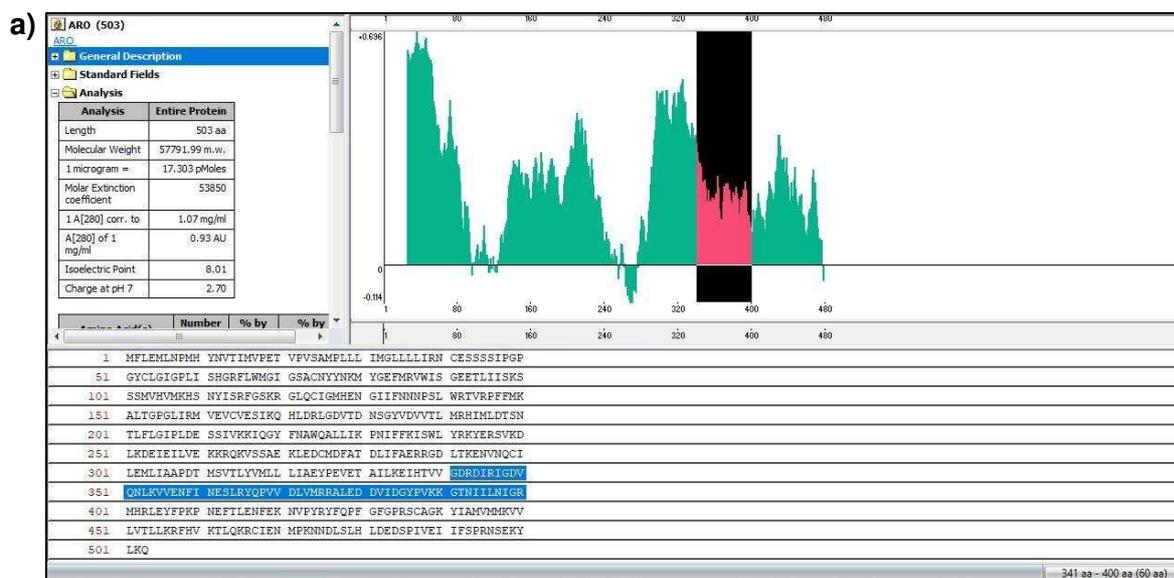
elementos de unión a miembros de la familia de receptores nucleares (NREa y NREb) y elementos similares al elemento de respuesta a AMPc (CLS).

4.4.4 Desarrollo de anticuerpos policlonales para la detección de ARO y 5 α -R.

Teniendo en cuenta el rol del E₂ y de la alopregnanolona en el control de la ingesta, nos propusimos estudiar la expresión proteica de las enzimas ARO, responsable de la conversión de los andrógenos en estrógenos y 5 α -R, encargada de convertir progesterona en sus derivados reducidos, precursores de alopregnanolona. Por esto, estudiamos la expresión proteica de estas enzimas en los núcleos hipotalámicos ARC, PVN y VMN. Optamos por producir los anticuerpos específicos para estas enzimas en nuestro laboratorio, dado que los anticuerpos comerciales que evaluamos presentaron poca marcación específica, por lo que nos resultó muy difícil la puesta a punto de las IHQ.

4.4.4.1 Diseño y obtención de antígenos específicos.

Mediante el estudio bioinformático de la secuencia aminoacídica reportada para ARO y 5 α -R, se detectaron regiones de alta antigenicidad teórica (en la Figura 37 se muestra el análisis de secuencia para ARO; el procedimiento para seleccionar la secuencia antigénica de 5 α -R fue el mismo). Teniendo en cuenta estas regiones se seleccionó, en la secuencia nucleotídica correspondiente de cada proteína, el fragmento a ser amplificado por PCR para generar los antígenos. Dicho fragmento abarcó la región comprendida entre los aminoácidos 341 - 400 de la secuencia de ARO de *Rattus norvegicus* (nro. acceso Genbank: NP_058781.2) y la región comprendida entre los aminoácidos 157 - 209 de la secuencia de 5 α -R de *R. norvegicus* (nro. Acceso Genbank: NM_017070.3). El fragmento seleccionado para cada molécula fue traducido y comparado *in silico* con el resto del genoma de rata utilizando la herramienta BLAST protein-protein del sitio web del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), sin observarse alineamientos significativos con otras proteínas de rata.



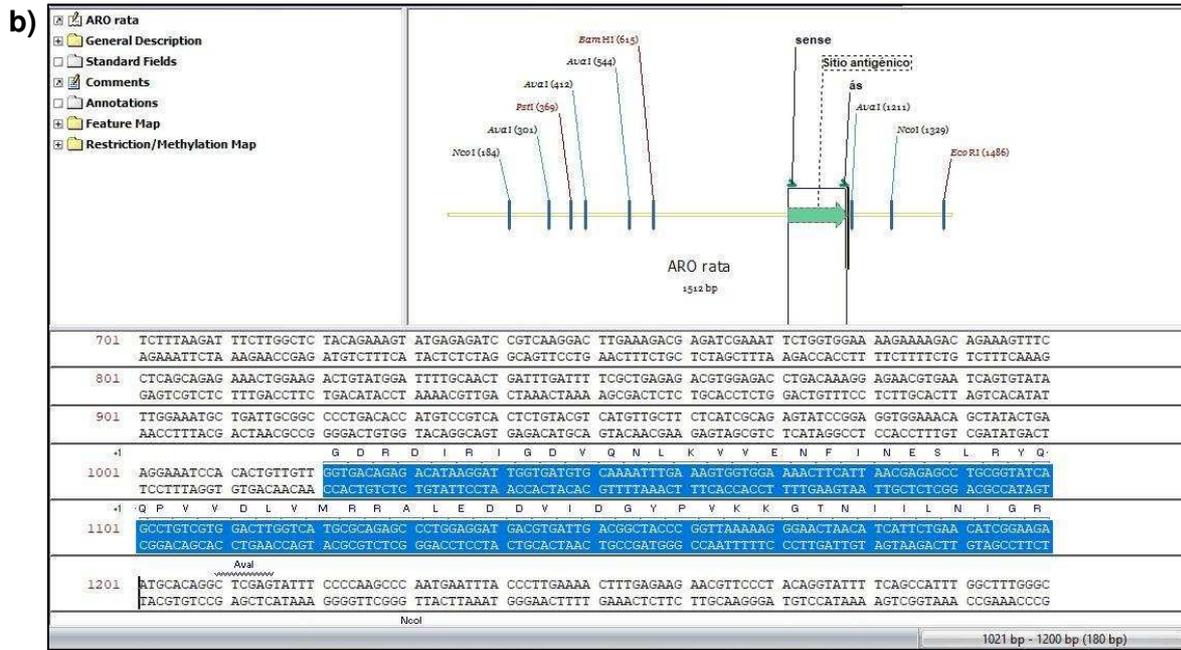


Figura 37. Selección del fragmento de la secuencia de aromatas (ARO), para ser utilizado como antígeno en la producción de un anticuerpo policlonal específico. (a) Análisis de la antigenicidad teórica de la proteína ARO. En rojo y negro se muestra la antigenicidad correspondiente al polipéptido codificado por la secuencia seleccionada. (b) Salida del programa informático Vector NTI. Se observa la secuencia codificante completa del gen de ARO de *R. norvegicus*. En azul se encuentra resaltada la región de la secuencia utilizada para generar el antígeno por PCR.

Siguiendo la estrategia de clonado direccional detallada en la sección 3.1.1.1 se obtuvieron antígenos que fueron purificados mediante columnas cromatográficas GSTrapTM. Las fracciones obtenidas durante la elución se separaron mediante SDS-PAGE y el gel fue teñido con Coomassie Blue (Figura 38).

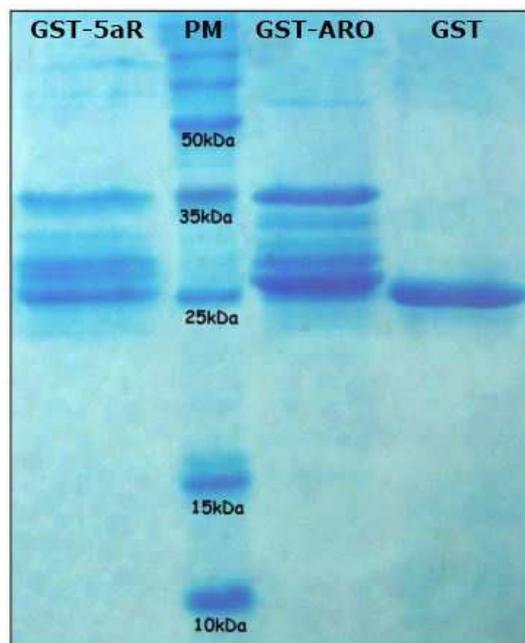
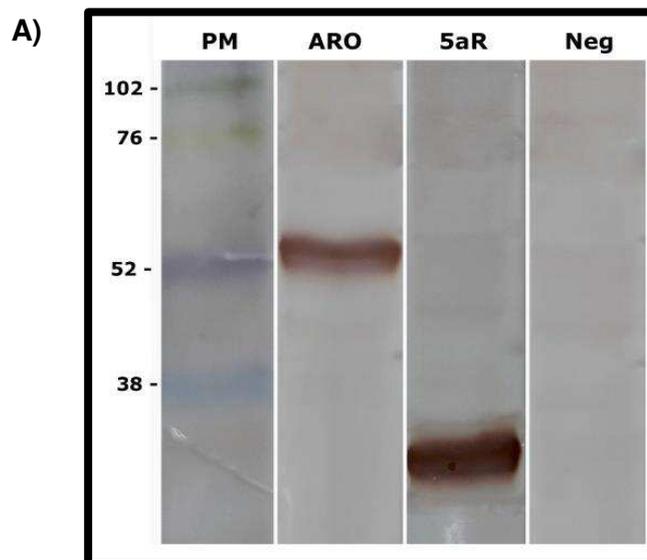


Figura 38. Purificación de los antígenos GST-ARO y GST-5aR mediante cromatografía de afinidad. Gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue. Se observan fracciones de una cromatografía realizada con GSTrap. De izquierda a derecha: GST-5aR purificada, marcador de peso molecular (PM), GST-ARO purificada y GST purificada.

En la Figura 38 se puede observar que las proteínas recombinantes purificadas estuvieron compuestas por tres péptidos mayoritarios. De acuerdo al peso molecular de las mismas, la banda de menor peso molecular correspondería a la proteína GST, la banda de mayor peso a GST-ARO o GST-5aR (aproximadamente 35 kDa) y la banda de peso intermedio podría deberse a una liberación prematura del complejo de traducción del plásmido, resultando en una proteína de peso intermedio conteniendo el extremo amino terminal de ARO y 5aR, respectivamente.

4.4.4.2 Generación y caracterización de los anticuerpos policlonales.

La caracterización de los anticuerpos específicos anti-ARO y anti-5aR obtenidos mediante inoculación de conejos se realizó por técnicas de Western blot e IHQ. En los ensayos de Western blot se observó una banda específica de 58 kDa para la proteína ARO y de 29 kDa para la proteína 5 α -R en extracto proteico de ovario de una hembra preñada en día gestacional 17 (Figura 39A). A continuación, para evaluar la inmunoreactividad en tejidos fijados en parafina, se realizaron ensayos de IHQ en secciones de ovario y se definió el patrón de expresión de ambas proteínas (Figura 39B). La marcación específica de la enzima 5 α -R se encontró en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de ovario, mientras que se detectó intensa inmunoreactividad específica de ARO como proteína mitocondrial, al observarse una marcación citoplasmática en patrón granular característico principalmente en las células de la granulosa. Las células de la teca también presentaron inmunomarcación positiva para ARO pero de menor magnitud (Figura 39b). No se detectó marcación específica cuando el anticuerpo primario (anti-ARO o anti-5aR) fue pre-incubado con el péptido utilizado como inmunógeno.



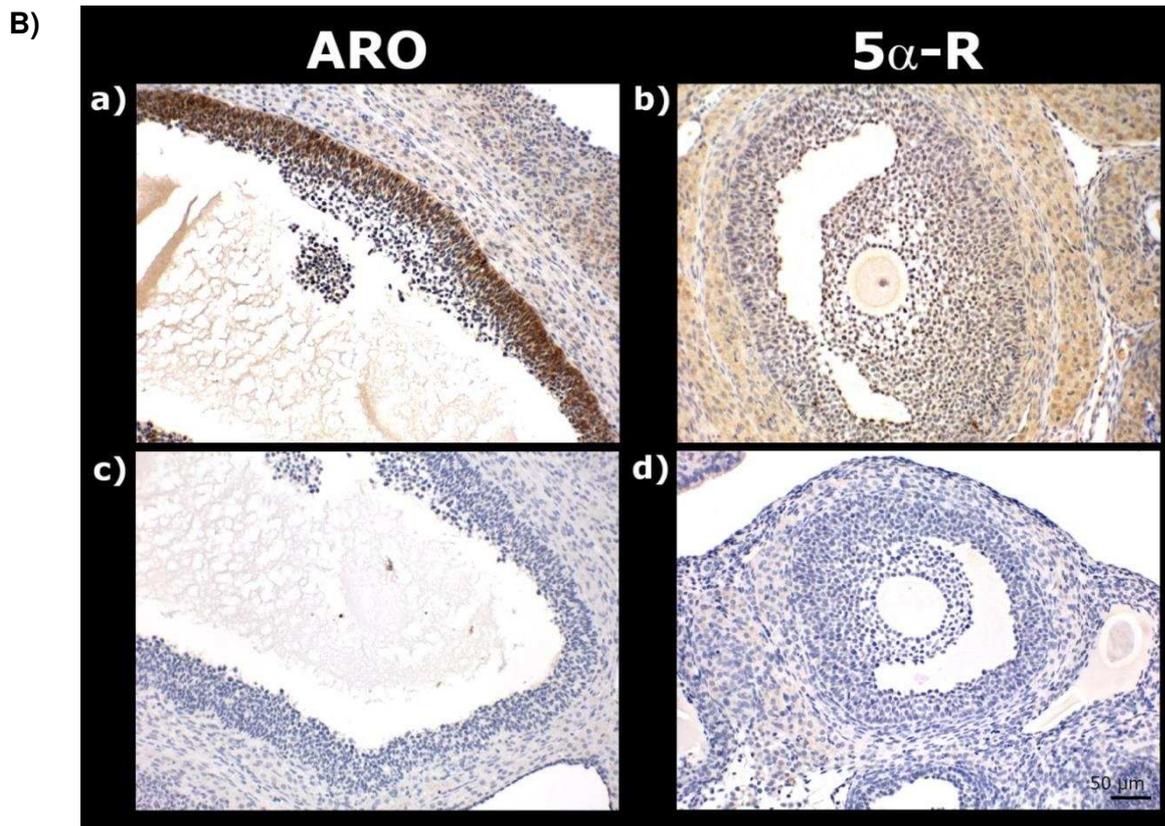


Figura 39. Caracterización de los anticuerpos anti-ARO y anti-5 α R en ovario de rata. (A) En los ensayos de Western blot se detectó la proteína ARO (58 kDa) y 5 α R (29 kDa) en ovario de rata. (B) La inmunoreactividad del anticuerpo (a) ARO y (b) 5 α R se evaluó por inmunohistoquímica en secciones de tejido de ovario. (a) La inmunoreactividad se observó como un patrón citoplasmático punteado compatible con una proteína localizada mitocondrial en el citoplasma de los ovocitos. (b) La marcación específica de la enzima 5 α -R se encontró en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca de ovarios de rata. (c y d) cuando los anticuerpos primarios fueron preadsorbidos con el antígeno correspondiente utilizado como inmunógeno no se observó marcación específica. La IHQ se reveló con DAB y se contrastó con hematoxilina de Mayers. Barras: 50 μ m.

4.4.4.3 Expresión proteica de ARO y 5 α R en núcleos hipotalámicos relacionados al control homeostático de la ingesta.

La expresión de las proteínas ARO y 5 α R se evaluó por IHQ en los núcleos ARC, PVN y VMN de hembras a las 20 semanas de dieta (Objetivo 4). Tanto en hembras C20 como CAF20, se detectó inmunoreactividad específica de la proteína ARO en neuronas de ARC, PVN y VMN, con su patrón de expresión citoplasmático y punteado, característico (Figura 40). Por otro lado, se observó inmunoreactividad específica de la proteína 5 α R en células de la glía en los núcleos ARC, PVN y VMN de animales C20 y CAF20 (Figura 40).

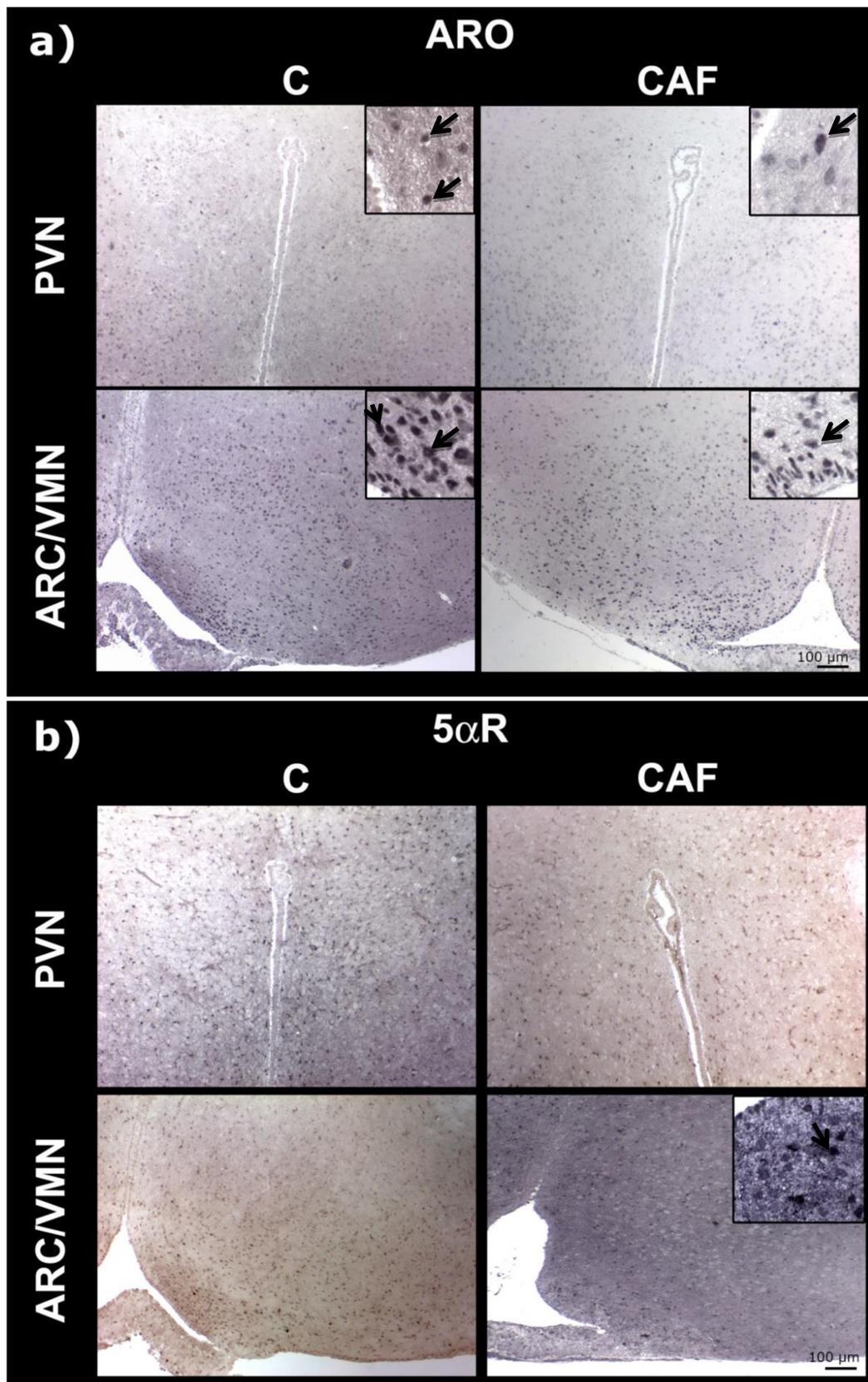


Figura 40. Análisis mediante inmunohistoquímica de los anticuerpos (a) anti-ARO y (b) anti-5αR en tejido hipotalámico de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) durante 20 semanas. Se observó marcación positiva para ARO y 5αR en los núcleos hipotalámicos PVN, ARC y VMN. Las inserciones a mayor aumento muestran que la expresión específica de ARO se observó en el citoplasma como un patrón punteado (flechas negras) y la marcación de 5α-R se encontró en células de la glía (flechas negras). Magnificación de las microfotografías: 600X.

4.4.4.4 Expresión proteica de RE α y RP en hipotálamo.

Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, los efectos del E₂ y de la progesterona sobre el balance de energía están mediados a nivel central principalmente por la unión a RE α y PR, respectivamente (Figura 41). Por lo tanto, evaluamos la expresión proteica de estos receptores por IHQ en los núcleos hipotalámicos ARC, PVN y VMN en hembras alimentadas con dieta C y CAF por 20 semanas. En el caso del RE α , se detectó como una proteína nuclear principalmente en ARC y VMN y en menor medida en PVN (Figura 41a). Por otro lado, el RP mostró un patrón nuclear sólo en los núcleos ARC y VMN, sin poder detectarse la proteína en PVN (Figura 41b).

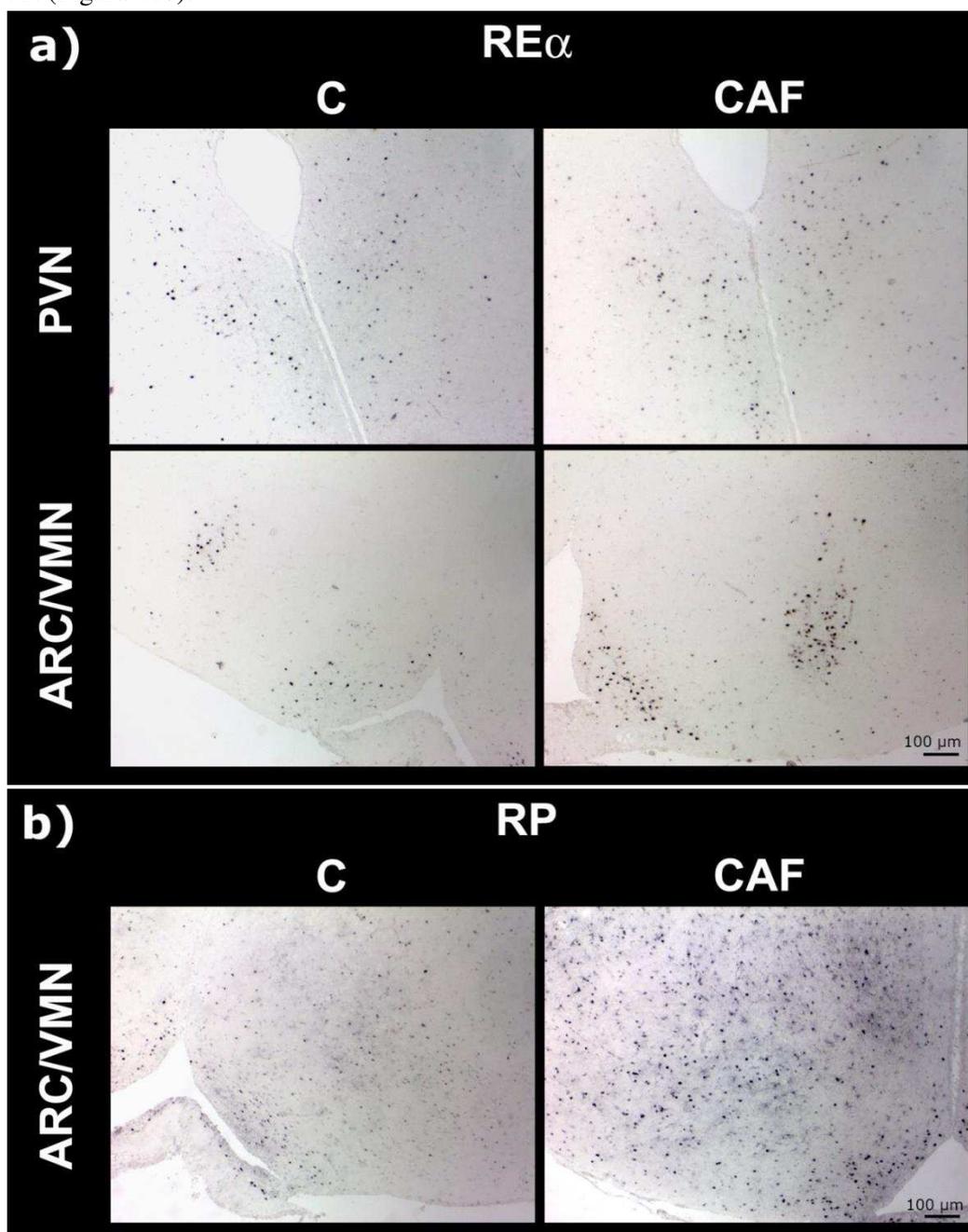


Figura 41. Expresión de RE α y PR en tejido hipotalámico de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF) durante 20 semanas. (a) La marcación específica de Re α fue observada en los núcleos de las células positivas de PVN, ARC y VMN tanto en hembras alimentadas con dieta control (C) como de cafetería (CAF) por 20 semanas. (b) La marcación de RP fue observada sólo en los núcleos de las células de ARC y VMN tanto en hembras alimentadas con dieta C como CAF por 20 semanas.

4.5 EFECTO DE LA OBESIDAD MATERNA SOBRE LAS ÁREAS CEREBRALES INVOLUCRADAS EN EL CONTROL HOMEOSTÁTICO Y HEDÓNICO DE LA INGESTA EN LA PROGENIE (F1) – OBJETIVO 7.

4.5.1 Efecto de la dieta materna sobre el peso corporal de la progenie.

En primer lugar, se realizó el seguimiento semanal del peso corporal de las hembras C y CAF a lo largo de toda la preñez. Durante la misma se mantuvo la diferencia significativa de peso entre los grupos dietarios, que llegó a ser de 290 ± 8 g para C y de 340 ± 10 g para CAF, a los 21 días de gestación (E21). El peso corporal de los embriones C-E21 y CAF-E21 fue evaluado al momento del sacrificio, sin presentar diferencia significativa entre ellos. Luego del parto el peso corporal de la progenie fue registrado cada dos días hasta el DPN10 (Figura 42). A lo largo de todo el seguimiento el peso de las crías provenientes de hembras CAF fue significativamente menor a lo de las provenientes de hembras C ($p < 0,05$). Cabe mencionar que durante este periodo no se detectaron diferencias aparentes en cuanto el comportamiento materno entre los grupos M-CON y M-CAF.

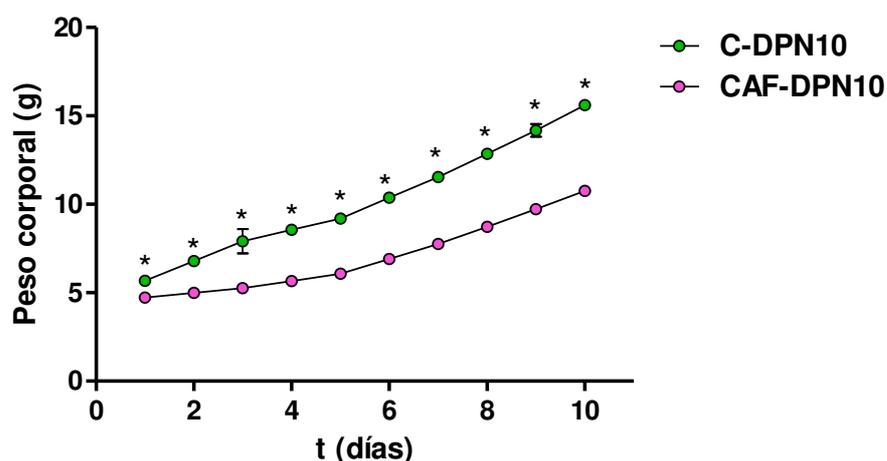


Figura 42. Curva de peso corporal de la F1 en periodo de lactancia. Se graficó el peso corporal promedio de las crías de madres tratadas con dieta C (C-DPN10) y CAF (CAF-DPN10) desde el día postnatal 1 al 10 en función de los días de vida ($n=12$ /grupo). Los valores son graficados como la media \pm el SEM. * indica diferencia significativa con $p < 0,05$ utilizando el test t no pareado de dos colas.

4.5.2 Efecto de la dieta materna sobre los mecanismos homeostáticos de control de la ingesta en la progenie.

4.5.2.1 Efecto sobre la expresión de neuropéptidos.

Con el fin de conocer si la dieta materna CAF genera cambios en el sistema homeostático de control de la ingesta en la progenie durante la preñez y lactancia, se estudió la expresión génica de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos en áreas hipotalámicas discretas de ratas hembra en día E21 y PND10 (Figura 43). En los animales CAF-E21, la dieta materna disminuyó la expresión de *Pomc* ($p < 0,001$) y *Cart* ($p < 0,05$) en el AHP. La disminución en los niveles de *Pomc* ($p < 0,01$) se mantuvo en los animales CAF-DPN10, no así la de *Cart*.

La edad también afectó la expresión de los neuropéptidos en la progenie. En AHP, los niveles de *Cart* ($p < 0,0001$), *AgRP* ($p < 0,05$) y *Npy* ($p < 0,001$) se incrementaron con la edad, a diferencia de la expresión de PND10 (Figura 43a). En los animales CAF-E21, la dieta materna disminuyó la expresión de ($p < 0,0001$) que presentó una disminución, tanto para las crías de las hembras alimentada con dieta C como CAF. En AHL, se observó un aumento de la expresión de *Ox* con la edad ($p < 0,0001$; Figura 43b).

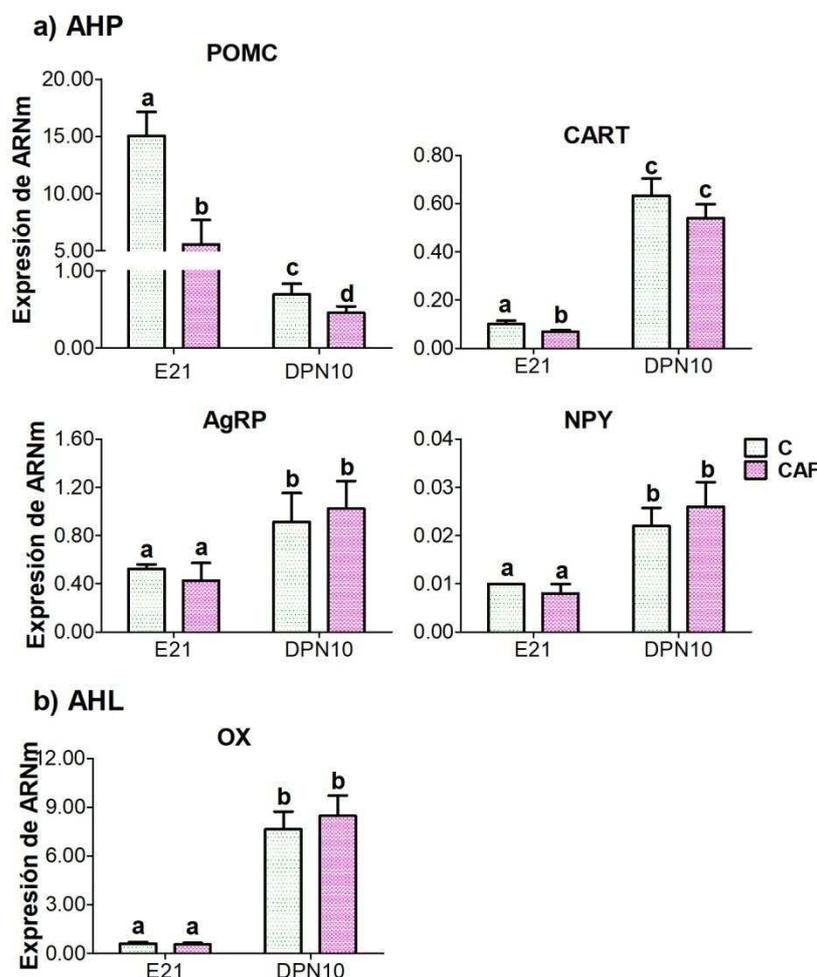


Figura 43. Expresión génica de neuropéptidos en (a) Área Hipotalámica Periventricular (AHP) y (b) Área Hipotalámica Lateral (AHL) de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.5.2.2 Efecto sobre la expresión génica de receptores hormonales.

Con el fin de analizar si la dieta materna afecta la expresión de receptores hormonales, los niveles de *Obrb*, *Rins* y *Ghsr* fueron estudiados en la progenie (Figura 44). En E21, las crías provenientes de madres alimentadas con dieta CAF disminuyeron la expresión de *Obrb* en AHL ($p < 0,05$; Figura 44b). En DPN10, las crías CAF-PND10 no presentan cambios en la expresión de receptores hormonales respecto a las C-DPN10.

La edad también tuvo un efecto en la expresión de receptores hormonales. En AHP la expresión de *Rins* disminuyó con la edad ($p < 0,0001$; Figura 44a). Por otro lado, en AHL se vio un aumento en la expresión de *Ghsr* con la edad ($p < 0,001$), independientemente de la dieta materna (Figura 44b).

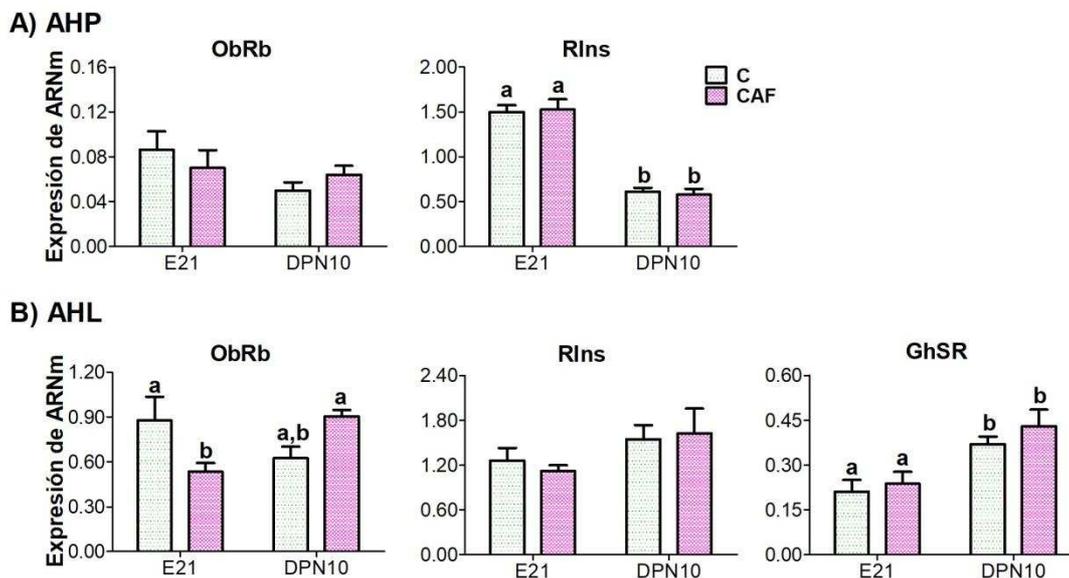


Figura 44. Expresión absoluta de receptores hormonales ObRb, Rins y GhSR en (a) Área Hipotalámica Periventricular (AHP) y (b) Área Hipotalámica Lateral (AHL) de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.5.2.3 Efecto de la dieta materna sobre los mecanismos hedónicos de control de la ingesta en la progenie.

- **La dieta materna CAF modifica la expresión génica de moléculas claves implicadas en el sistema dopaminérgico de la progenie.**

Para determinar el efecto de la dieta materna CAF sobre el sistema dopaminérgico de la F1, se analizó la expresión de moléculas implicadas en la síntesis, transporte y recaptación de DA en regiones clave del cerebro (Figura 45). En E21, la dieta materna CAF no afectó la expresión de ninguna de las moléculas estudiadas. Sin embargo, en DPN10, la dieta materna disminuyó la expresión de *Th* ($p < 0,001$), *Drd2* ($p < 0,01$) y *Dat* ($p < 0,001$) en ATV (Figura 45a) y la de *Drd1* ($p < 0,01$), *Drd2* ($p < 0,01$) y *Dat* ($p < 0,05$) en NAc de crías CAF-DPN10 (Figura 45b). Además, se observó una disminución en la expresión de *Drd2* ($p < 0,05$) en CeA de CAF-DPN10 respecto a C-DPN10 (Figura 45d).

La edad también afectó la expresión de estas moléculas. En ATV (Figura 45a) y en NAc (Figura 45b), la expresión de *Th*, *Drd1* y *Drd2* aumentó con la edad ($p < 0,0001$; excepto *Th* en NAc: $p < 0,05$). A su vez, en ATV se observó un incremento de los niveles de *Dat* ($p < 0,0001$), tanto en crías provenientes de madres alimentadas con dieta C como CAF (Figura 45a). Por otra parte, en BLA la expresión de *Drd1* ($p < 0,0001$) y *Drd2* ($p < 0,01$) aumentó con la edad (Figura 45c).

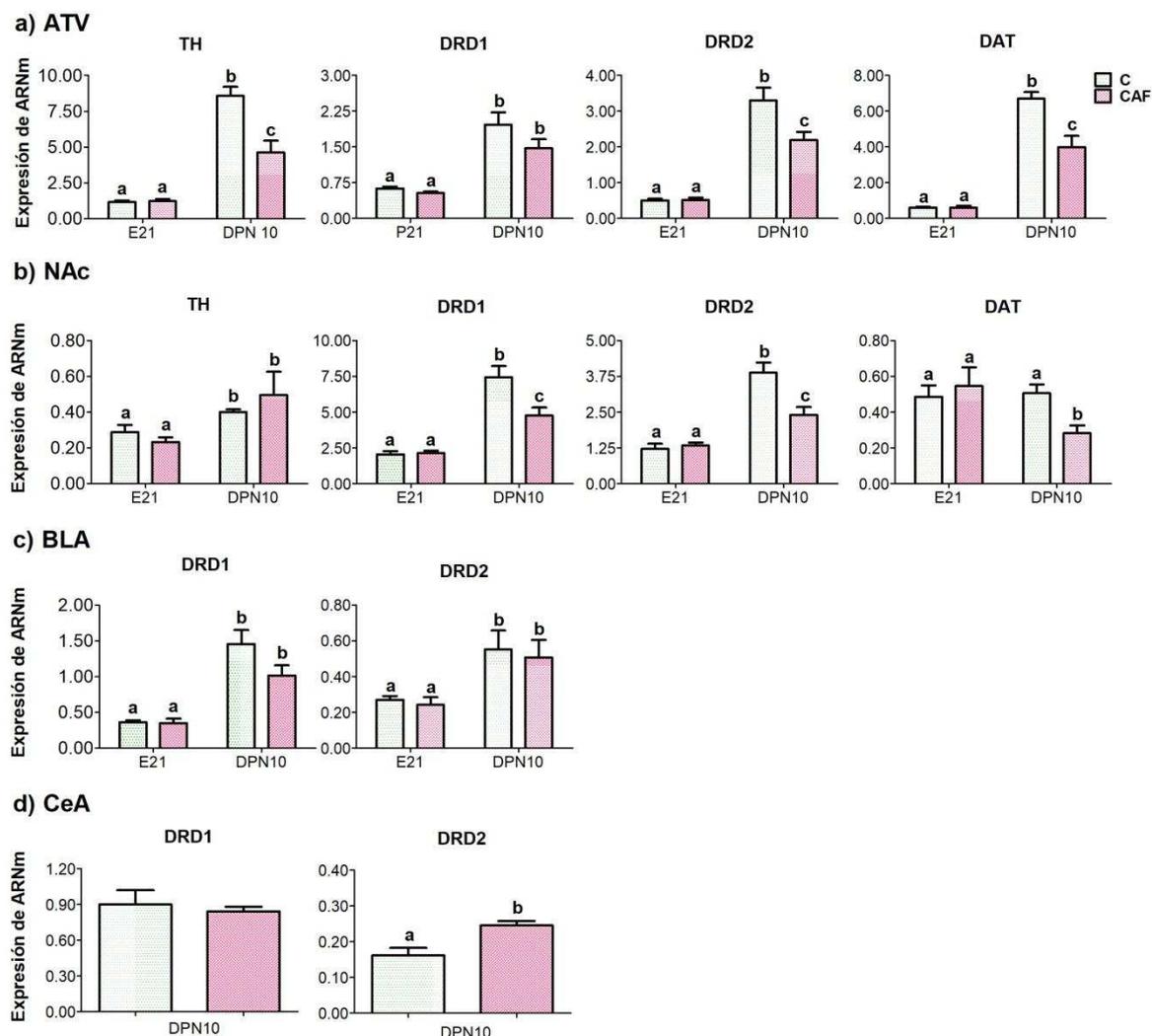


Figura 45. Expresión génica de TH, DRD1, DRD2 y DAT en (a) ATV, (b) NAc, (c) BLA y (d) CeA de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey. Para el análisis de expresión en CeA se aplicó el test de Mann Whitney, considerándose diferencia significativa a $p < 0,05$.

- **La dieta materna CAF varía la expresión génica de las enzimas involucradas en la síntesis de GABA en la descendencia.**

Con el objetivo de estudiar cómo la dieta materna CAF podría afectar la síntesis de GABA de la progenie, se analizó la expresión de las enzimas implicadas en la misma (Figura 46). No se encontraron cambios en la expresión de estas enzimas en los animales E21. Sin embargo, se observó una disminución en los niveles de *Gad1* ($p < 0,0001$) en ATV de las crías CAF-DPN10 (Figura 46a).

La edad de los animales también afectó la expresión de *Gad1* y *Gad2*, ya que ambas enzimas incrementaron su expresión tanto en ATV (Figura 46a) como en AHL (Figura 46b) en crías DPN10 en relación a E21 ($p < 0,0001$).

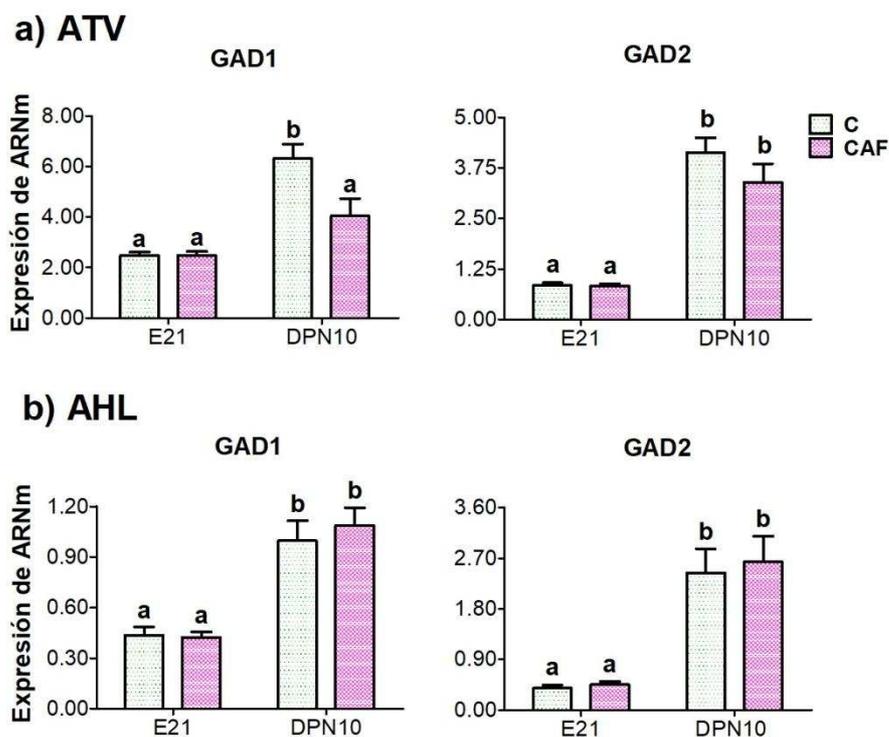


Figura 46. Expresión absoluta de GAD1 y GAD2 en (a) ATV y (b) AHL de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

- **La dieta materna CAF afecta la expresión de moléculas implicadas en el sistema opioide en la descendencia.**

Para analizar como la dieta materna CAF podría influir en el sistema opioide de la progenie, se evaluó la expresión de *Mor*, principal subtipo de receptor opioide implicado en la activación del sistema de recompensa (Figura 47). En E21, la dieta materna CAF no afectó la expresión de este receptor. En cambio, en los animales CAF-DPN10 se observó un marcado aumento en la expresión de *Mor* en BLA ($p < 0,001$) respecto a los C-DPN10 (Figura 47d).

Los niveles de expresión de *Mor* también se vieron afectados por la edad. Los niveles de ARNm de *Mor* aumentaron con la edad tanto en ATV (Figura 47a) como en AHL ($p < 0,0001$; Figura 47c), a diferencia de NAc ($p < 0,0001$; Figura 47b), núcleo en el cual la expresión disminuyó con la edad, en crías de madres alimentadas con dieta C como CAF.

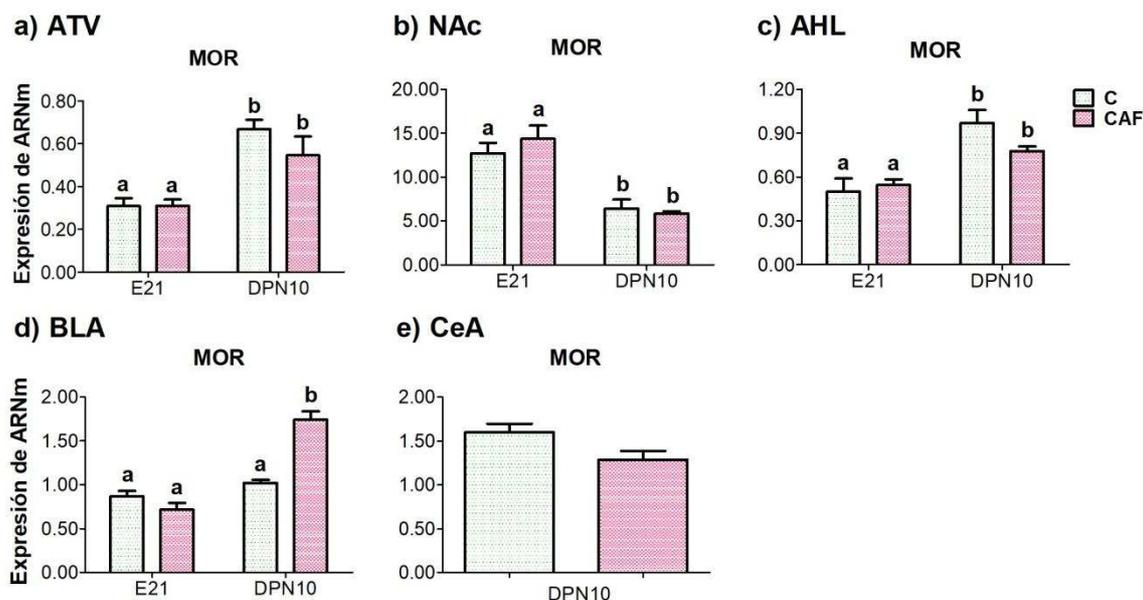


Figura 47. Expresión génica de MOR en (a) ATV, (b) NAc, (c) AHL, (d) BLA y (e) CeA de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey. Para el análisis de expresión en CeA se aplicó el test de Mann Whitney, considerándose diferencia significativa a $p < 0,05$.

- **La dieta materna CAF afecta la expresión de moléculas relacionadas al sistema de OX en la descendencia.**

Con el fin de estudiar si la dieta materna CAF podría modificar la vía de las OX en el cerebro de la progenie, se evaluó la expresión sus receptores en ATV y NAc (Figura 48). La dieta materna CAF no alteró la expresión de ninguno de los receptores en crías E21. En cambio, las crías CAF-DPN10 disminuyeron la expresión de *Hcrtr2* tanto en ATV (Figura 48a) como en NAc ($p < 0,001$; Figura 48b).

La expresión de *Hcrtr1* y de *Hcrtr2* también se vio afectada por la edad, al aumentar en ATV y en NAc ($p < 0,0001$; Figura 48 a y b) tanto en crías de madres alimentadas con dieta C como CAF.

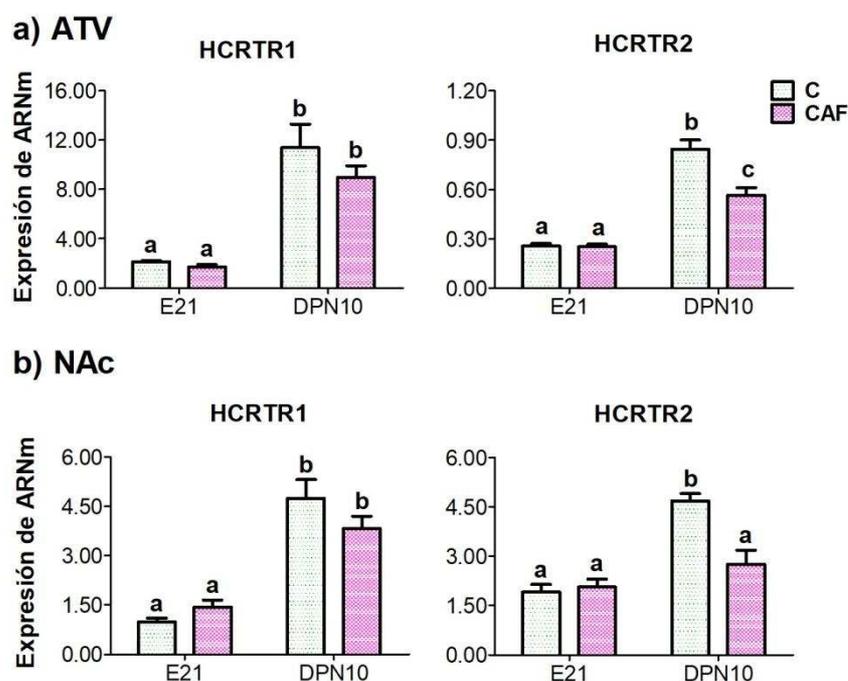


Figura 48. Expresión absoluta de HCRTR1 y HCRTR2 en (a) ATV y (b) NAc de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

- **La dieta materna CAF altera la expresión génica de los receptores hormonales en la descendencia.**

Para determinar si la dieta materna CAF podría modificar la acción de las hormonas relacionadas al control de la ingesta - leptina, insulina y ghrelina - en la progenie, se midió la expresión de sus receptores en áreas claves del sistema de recompensa (Figura 49). En P21 no se encontraron cambios en la expresión de ninguno de los receptores entre las crías provenientes de madres alimentadas con dieta CAF vs. C. En las crías DPN10, sólo se encontró una disminución en la expresión de *Ghsr* ($p < 0,001$) en ATV de CAF-DPN10 (Figura 49a).

La edad también afectó la expresión de los receptores en todas las áreas estudiadas. En ATV, la expresión de *Obrb* ($p < 0,01$), *Rins* ($p < 0,001$) y *Ghsr* ($p < 0,0001$) aumentó con la edad (Figura 49a). En NAc, los niveles de ARNm de *Obrb* ($p < 0,0001$) y *Rins* ($p < 0,05$) disminuyeron con la edad (Figura 49b). Por último, en BLA la expresión de *Rins* y *Ghsr* ($p < 0,0001$) aumentó con la edad tanto en la progenie de hembras alimentadas con dieta C como CAF (Figura 49c).

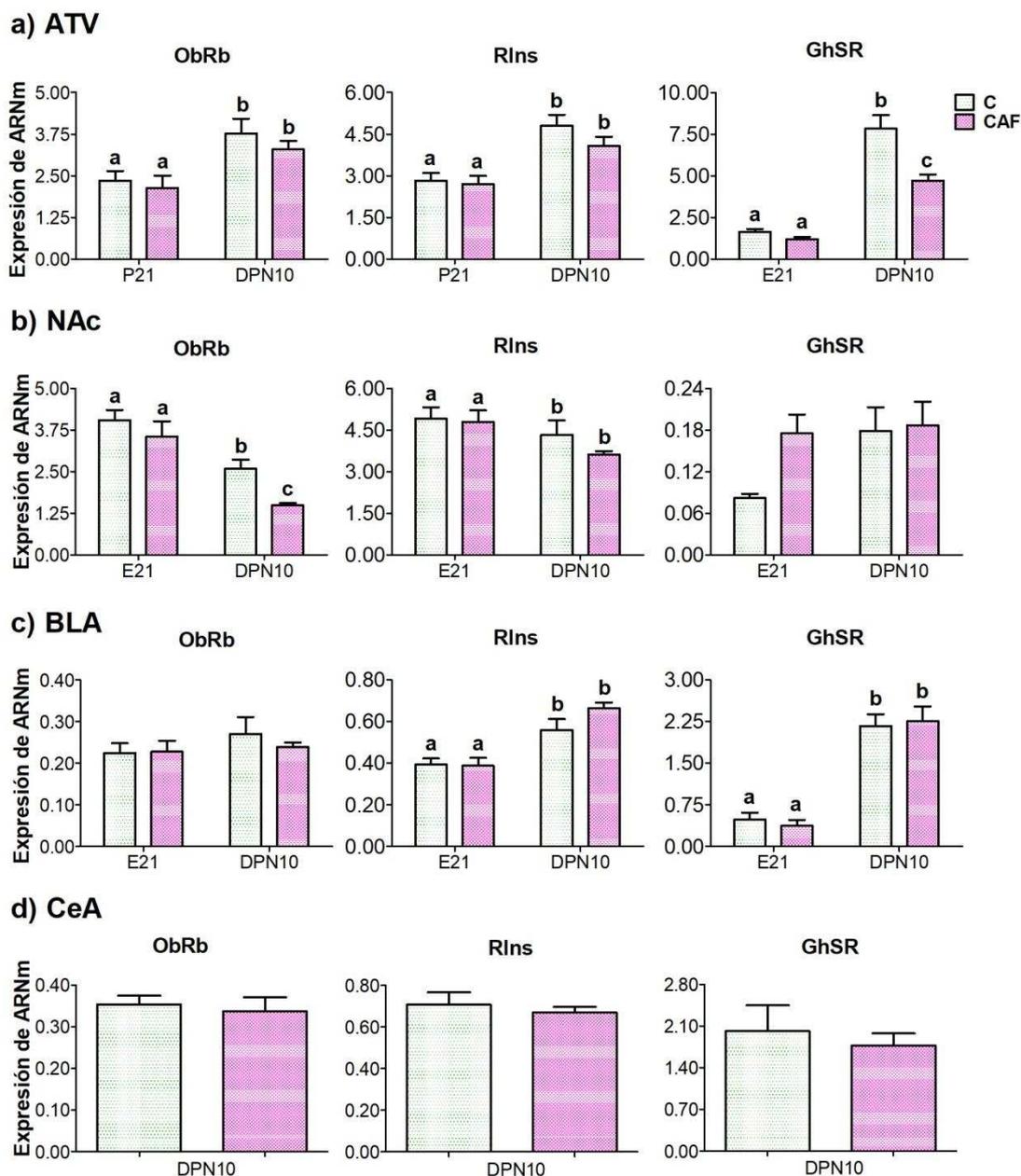


Figura 49. Expresión génica de receptores hormonales ObRb, RIns y GhSR en (a) ATV, (b) NAc, (c) BLA y (d) CeA de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey. Para el análisis de expresión en CeA se aplicó el test de Mann Whitney, considerándose diferencia significativa a $p < 0,05$.

- **La dieta CAF produce cambios en el estado de metilación de las regiones regulatorias de moléculas clave de la vía dopaminérgica en ATV y NAc.**

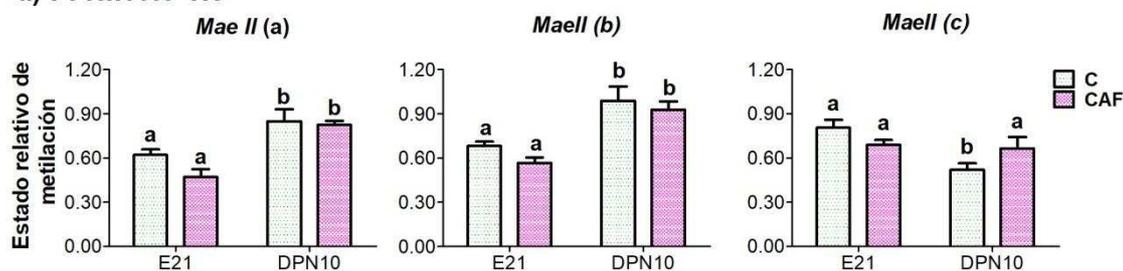
Para determinar si los cambios producidos por la dieta CAF en la expresión de las moléculas de la vía dopaminérgica en ATV (Figura 50) y NAc (Figura 51) de la proge de hembras alimentadas con dieta C y CAF podrían estar mediados por mecanismos de metilación del ADN, fueron evaluadas las secuencias promotoras de dichos genes. Así, se encontró que en ATV, los niveles de metilación del sitio *Mae II* (c) del promotor de *Th* aumentaron en CAF-DPN10 ($p < 0,05$; Figura 50a). En este estadio también se encontró un aumento en los niveles de

metilación del sitio *BstUI* del promotor *Drd1* ($p < 0,05$; Figura 50b). Para el promotor de *Drd2* se registró un aumento en sus niveles de metilación tanto en crías CAF-E21 como CAF-DPN10 ($p < 0,05$; Figura 50c). Por último, se encontró un aumento en el sitio *Sma I* del promotor de *Dat* en CAF-DPN10 ($p < 0,05$; Figura 50d). En NAc, se encontró un aumento en los niveles de metilación de los sitios *BstUI* del promotor de *Drd1* ($p < 0,05$; Figura 51b) y *Sma I* del promotor de *Dat* ($p < 0,01$; Figura 51d) en CAF-DPN10.

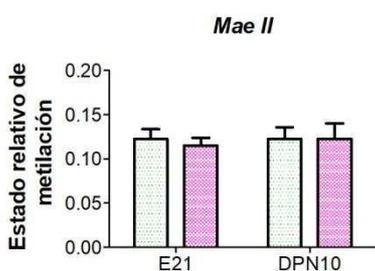
La edad también afectó los niveles relativos de metilación de los promotores. En ATV, los niveles de metilación de los sitios *Mae II* (a) y *Mae II* (b) de *Th* aumentaron con la edad ($p < 0,001$), mientras que los de *Mae II* (c) disminuyeron con la misma ($p < 0,05$; Figura 50a). Por otro lado, el promotor de *Drd1* disminuyó sus niveles de metilación en el sitio *BstUI* con la edad ($p < 0,0001$; Figura 50b).

ATV

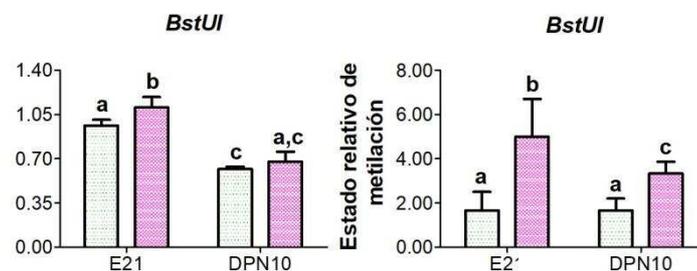
a) Promotor TH



b) Promotor DRD1



c) Promotor DRD2



d) Promotor DAT

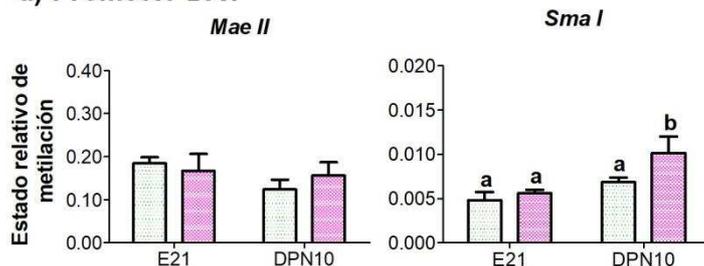
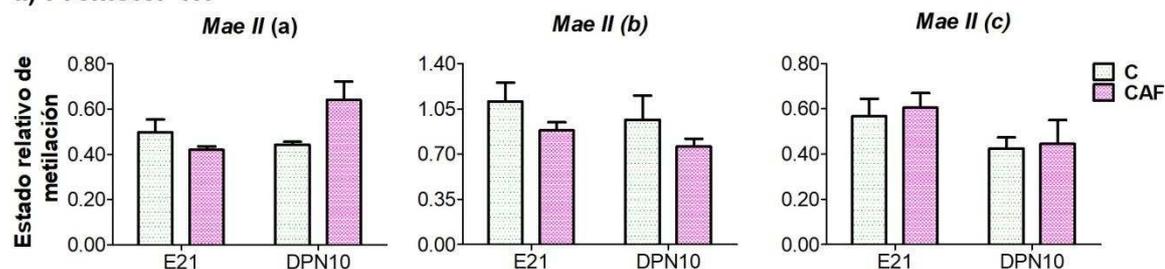


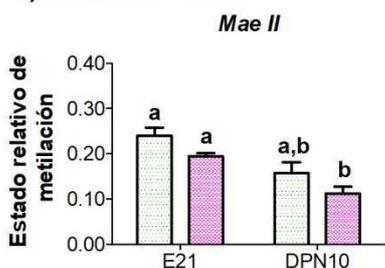
Figura 50. Análisis de metilación de los promotores de los genes de: (A) TH; (B) DRD1, (C) DRD2 y (D) DAT en ATV de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

NAc

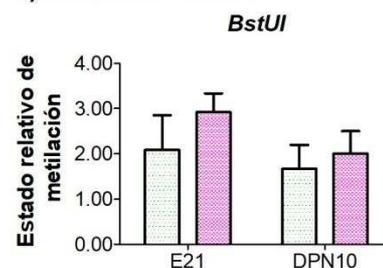
a) Promotor TH



b) Promotor DRD1



c) Promotor DRD2



d) Promotor DAT

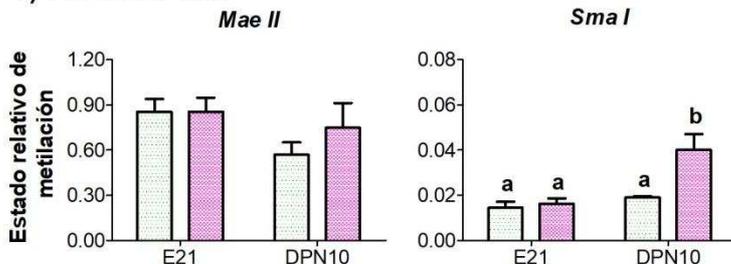


Figura 51. Análisis de metilación de los promotores de los genes de: (a) TH; (b) DRD1, (c) DRD2 y (d) DAT en NAc de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=6-8$ /grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

4.5.2.4 Efecto de la dieta materna CAF sobre la expresión de enzimas neurosteroidogénicas en el hipotálamo de la progenie.

Se estudió la expresión de enzimas neurosteroidogénicas en AHP de la progenie con el fin de determinar si las mismas son afectadas por la dieta materna CAF. En E21 no se encontraron cambios en la expresión de las enzimas estudiadas (Figura 52). Sin embargo, en DPN10 se detectó un incremento en los niveles de ARNm de 3α -HSD ($p < 0,01$) de crías provenientes de madres CAF en relación a las C.

La edad también afectó la expresión de las enzimas neurosteroidogénicas, ya que tanto los niveles de 5α -r como los de 3α -hsd ($p < 0,0001$) aumentaron en DPN-10 respecto a E21, para crías provenientes de madres alimentadas tanto con dieta C como CAF.

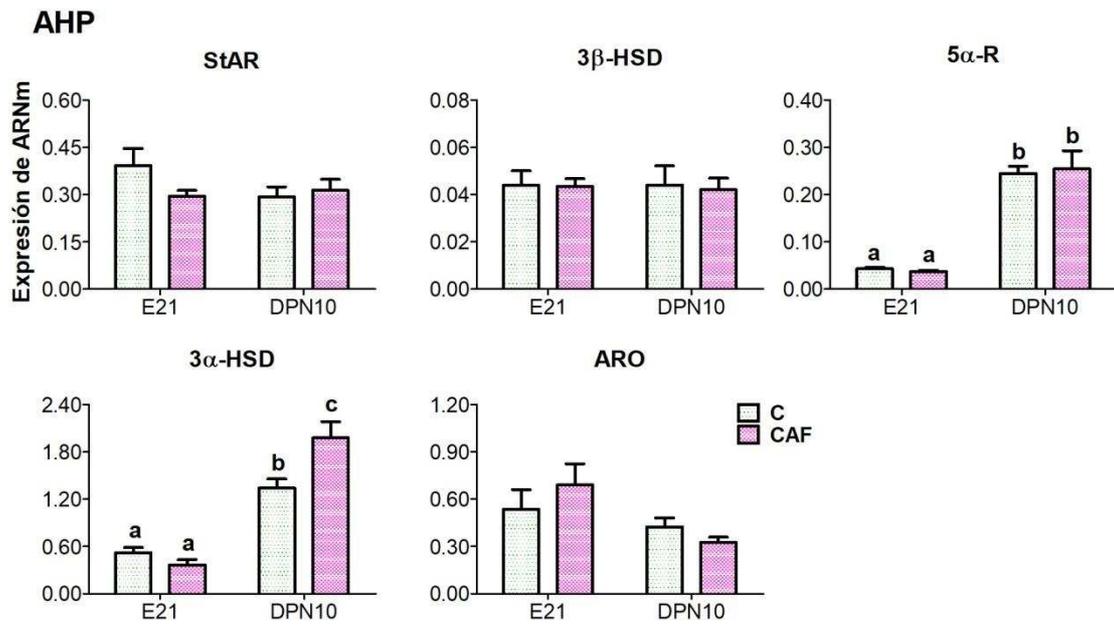


Figura 52. Expresión absoluta de enzimas neuroesteroideogénicas en AHP de crías en estadio embrionario 21 (E21) o Día postnatal 10 (DPN10) obtenidas de hembras alimentadas con dieta control (C) o de cafetería (CAF). Las columnas y las barras de error representan la media±SEM (n=6-8/grupo). Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$ según ANOVA de 2 vías seguido de post-test de Tukey.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El deseo por la comida es parte de la naturaleza humana. En un ambiente que facilita el acceso y en el cual se ve estimulado el consumo de comidas de alta palatabilidad resulta complejo comprender las señales que llevan a ingerir alimentos en exceso y a desarrollar obesidad [85]. Así, el problema de sobrepeso y obesidad se encuentra estrechamente asociado al consumo de alimentos procesados de alto contenido energético, ricos en grasas y carbohidratos. Independientemente del estado de hambre o saciedad, la ingesta puede ser influenciada por la sensación placentera que genera cada alimento. De este modo, no es sólo el balance energético el que dirige la ingesta alimenticia, sino que el valor de recompensa asociado un alimento también tiene un rol fundamental [175]. Por otro lado, no sólo ha sido reportado que el hipotálamo es capaz de sintetizar neuroesteroides *de novo*, sino también que las hormonas esteroides pueden afectar la ingesta energética de forma diferencial [176]. Sin embargo, resulta desconocido si cambios en la ingesta afectan la síntesis de neuroesteroides, particularmente a nivel hipotalámico. Por todo esto, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la ingesta de una dieta CAF en ratas hembra a lo largo del tiempo, específicamente en un estado de normopeso (corto plazo), sobrepeso (mediano plazo) y obesidad (largo plazo), evaluando cambios en la ingesta, parámetros metabólicos y en la expresión de neuropéptidos, receptores de hormonas y neurotransmisores involucrados en los sistemas homeostático y de recompensa, en núcleos cerebrales discretos. Además, se analizó la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas en núcleos hipotalámicos discretos para obtener un abordaje integrado del modelo de obesidad desde los múltiples aspectos que lo conciernen. En base a los resultados obtenidos, propusimos que modificaciones epigenéticas podrían estar involucradas en todos estos procesos. Por último, estudiamos el efecto de la dieta materna CAF sobre los sistemas de control de ingesta homeostático y de recompensa y sobre la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas en la progenie.

- ***La dieta CAF altera la ingesta e incrementa la adiposidad, el peso corporal y los niveles de leptina circulante.***

Numerosos estudios han reportado el efecto de la CAF sobre el desarrollo de la obesidad, sin embargo dependiendo de los alimentos seleccionados, el tiempo de administración, la edad y el sexo de los animales, entre otras variables, difieren los resultados respecto al desarrollo de síndrome metabólico y la sensibilidad a diversas hormonas [136,169,177,141,138]. En este sentido, dado que son pocos los autores que han reportado las consecuencias de administrar esta dieta en ratas hembra desde el destete, estudiamos el cambio en la ingesta como promotor de alteraciones en el peso corporal y de los tejidos adiposos y su relación con los cambios metabólicos. Los animales alimentados con CAF mantuvieron una ingesta energética significativamente mayor a partir de la segunda y a lo largo de las 20 semanas de dieta estudiadas, en concordancia con lo que ha sido reportado por otros grupos en estudios realizados en hembras desde el destete [136,178-180]. Cabe destacar que tanto los animales C como CAF mostraron un

marcado incremento en la ingesta energética desde el destete y hasta la tercer semana de dieta, probablemente debido a la alta tasa de crecimiento de los animales a esa edad [181]. Luego de este punto y hasta la semana 11 de dieta, ambos grupos dietarios presentaron un aumento en la ingesta energética diaria similar, aunque la misma siempre fue mayor para los animales alimentados con CAF. Posteriormente los animales CAF continuaron aumentando su consumo de energía diario a una tasa mayor que los animales alimentados con alimento balanceado, los cuales mantuvieron una ingesta diaria prácticamente constante hasta la semana 20. Consecuentemente, esto llevó a una elevada ingesta energética acumulada por parte de los animales CAF respecto a los C en todos los puntos estudiados, tal como fuese reportado previamente tanto en hembras [178] como machos [182,183] alimentados con CAF desde el destete. Este perfil de ingesta variante a lo largo del tiempo nos brindaría indicios de que los mecanismos que regulan la ingesta cambiarían con la longitud del tratamiento dietario. Además, podría inferirse que este perfil de resultados es característico las dietas de estilo occidental ricas en grasas y azúcares, ya que han sido publicados diversos trabajos en donde se observó un incremento en la ingesta energética no sólo cuando la intervención dietaria comenzó en el destete sino también en la adultez, independientemente del tiempo de exposición a la misma [138,184,59,185,186].

Cabe destacar que, aunque la dieta CAF promovió una mayor ingesta energética, no produjo hiperfagia, indicativo de la significativamente mayor densidad calórica de los alimentos de alta palatabilidad respecto al alimento balanceado [182]. De esta manera, los animales CAF consumieron significativamente menores cantidades diarias de alimento que los C, lo que llevó a que la ingesta en masa acumulada sea menor en todos los puntos de tiempo estudiados. Este resultado es dicotómico, dado que ha sido reportado tanto que este tipo de dieta incrementa la masa de alimento consumida [138,185,187,141] como que no produce hiperfagia [182]. Además, pese a que la ingesta diaria fue menor respecto a los animales C, esta se vio incrementada a lo largo del tiempo en los animales CAF, indicando que habría un efecto de la dieta independientemente de la edad de los animales. Si bien en la presente Tesis no se determinó el patrón de alimentación a lo largo del ciclo luz-oscuridad, algunos autores han reportado que este tipo de dieta promueve el consumo de pequeñas cantidades de alimento de manera frecuente (*snacking*) luego de 5 semanas de dieta, lo cual deja de observarse luego de 10 semanas de intervención dietaria. Sin embargo, este comportamiento no afecta la cantidad diaria ingerida en términos de masa y energía [141]. Además, la bibliografía sugiere que este comportamiento puede deberse a una menor saciedad causada por el alimento ingerido, que cambiaría al extenderse el tiempo de dieta, reflejando así una tolerancia a la palatabilidad [141,188]. De este modo, la ingesta frecuente de comidas de alto contenido energético en estadíos tempranos podría llevar a la ganancia de peso en el largo plazo.

Una de las principales características de la dieta CAF es que promueve la libre elección de los alimentos que el animal consume [168], lo cual condiciona la ingesta de macronutrientes, ya

que los alimentos de alta palatabilidad seleccionados poseen diversa composición de los mismos. Pese a la gran variabilidad de alimentos ofrecidos, se ha observado que la ingesta en macronutrientes se mantuvo constante durante los distintos estadios de intervención dietaria estudiados (corto, mediano o largo plazo), consumiendo una mayor proporción de grasas en función de la energía total ingerida (3 veces más) y menor proporción de proteína (cerca de un 50% menos) y carbohidratos respecto de los animales C, tal como fuese reportado por otros autores en diversos modelos de CAF [9,138,189,169]. La dieta CAF ofrecida posee en promedio un elevado contenido de grasas (46%) y baja cantidad de proteínas (8%). Estos porcentajes revelan que el proceso de elección de los alimentos ingeridos lleva a incrementar el consumo de proteínas y disminuir el de grasas como mecanismo compensatorio, lo cual podría explicar, en parte, la ausencia cambios en el metabolismo de la glucosa y de síndrome metabólico.

Otra característica de la dieta CAF es que la forma de administración de los distintos alimentos permite la evaluación de la selección de gustos y preferencias realizadas con el animal a lo largo del tiempo [190]. De esta manera pudimos observar que los animales alimentados con CAF eligieron los distintos ítems de comida de alta palatabilidad ofrecidos por sobre el alimento balanceado, prefiriendo siempre el sabor dulce sobre el salado, diferencia que se incrementa a lo largo del tiempo. De forma innata, tanto los humanos como los roedores jóvenes tienen una preferencia mayor por el sabor dulce, la cual va disminuyendo desde finales de la adolescencia hasta la edad adulta [191,192]. Sin embargo, esta baja en la preferencia al sabor dulce se ve alterada en individuos obesos [192,193]. Particularmente, se ha sugerido que la respuesta neuronal a las comidas de sabor dulce es menor en mujeres propensas al aumento de peso, necesitando una mayor ingesta de las mismas para obtener la misma respuesta [194]. De esta forma, la mayor elección de alimentos dulces por parte de las hembras CAF en el mediano y largo plazo podría deberse a una desregulación neuronal vinculada al sobrepeso y la obesidad. Además, los cambios observados en la preferencia por los sabores a lo largo de la intervención dietaria podrían estar relacionados a que los mecanismos que controlan la ingesta en los distintos plazos estudiados son diferentes.

En el **corto plazo**, las ratas hembra alimentadas desde el destete con una dieta altamente apetecible mostraron no sólo una mayor ingesta de energía en comparación con los animales alimentados con alimento balanceado, sino también una mayor ingesta de grasas, lo cual refleja la alta palatabilidad de la dieta, sobretodo en animales jóvenes [139]. Esta mayor ingesta de grasa de los animales alimentados con CAF se mantuvo en el tiempo y persistió incluso cuando la misma excedía el requerimiento de energía. Las grasas dietarias alteran el monitoreo de nutrientes orales e intestinales [190,191], atenuando la detección de la ingesta excesiva de grasas y conduciendo a un consumo excesivo de alimentos ricos en ellas, independientemente de la disponibilidad continua de alimento balanceado. De esta manera, en el corto plazo la mayor ingesta de energía en hembras CAF estuvo acompañada por un aumento marcado en la deposición de grasa,

particularmente en las parches de TAPg y TAS, que aumentaron tres y seis veces su peso, respectivamente, en comparación con las ratas alimentadas con dieta C. Esto podría indicarnos que cada parche de tejido adiposo es sensible a la dieta de manera diferencial [192]. En este sentido, Ribot y col. [169] reportaron un incremento en el TAPg de hembras luego de 4 semanas de ingesta de dieta CAF. Los parches de TAPg y TAS estarían reflejando los efectos tempranos de la mayor ingesta energética de CAF. A pesar del gran aumento en la adiposidad, no hubo diferencias significativas en los niveles de leptina circulante o del peso corporal entre los animales alimentados con una dieta CAF o C a corto plazo, de acuerdo con otros autores [184,8,59]. Controversialmente, ha sido reportado que una ingesta a corto plazo de CAF tiene la capacidad de incrementar el peso corporal de los animales. Sin embargo, la mayoría de estos resultados se obtuvo comenzando la intervención dietaria en animales adultos (200-250g) y no desde el destete [178,177,195,190] o utilizando cepas de rata Sprague-Dawley, las cuales han demostrado ser más sensibles al incremento de peso corporal y a la adiposidad frente una dieta CAF que otras cepas de rata [196].

En el **mediano plazo**, se mantuvo la elevada ingesta energética en los animales CAF, llevando consecuentemente a un mayor aumento en el peso de los tejidos adiposos, principalmente TAPg y TARP lo que derivó en un incremento tanto del peso como de la ganancia de peso corporal de los animales, llevando al sobrepeso. En particular, el TAPg registró un aumento del 70%, convirtiéndolo en un tejido adiposo visceral muy sensible a la dieta. En este sentido, algunos autores han reportado un incremento de la ganancia de peso corporal similar a la encontrada por nuestro grupo cuando la dieta CAF se ofreció desde el destete tanto a hembras [180] como a machos [183]. Sin embargo, otros autores han reportado una ganancia de peso mayor en hembras alimentadas con CAF desde el destete pero utilizando ratas de la cepa Sprague-Dawley [136]. La leptina es una hormona producida principalmente por los adipocitos y una señal de las reservas energéticas que participa en el control de la ingesta y el gasto energético [197,37]. En este sentido, nuestros resultados muestran que los cambios en la adiposidad a mediano plazo estuvieron acompañados por un marcado aumento en la concentración sérica de leptina, llegando a ser esta 50% mayor en los animales CAF vs. C, en concordancia con lo reportado por otros autores [183].

Todos estos cambios metabólicos y moleculares se intensificaron a **largo plazo**, evidenciando un estado de obesidad. La ingesta prolongada de CAF continuó incrementando más rápidamente la adiposidad y el peso corporal: en particular los parches de TAPg se incrementaron un 74% y la ganancia de peso fue del 19% respecto a los animales C. Esto trajo aparejado un incremento de los niveles de leptina circulante, que llegaron a ser 3 veces mayores en animales CAF respecto a los C, al igual que fuese reportado por otros autores [198,199,179]. Sin embargo, a pesar de todas estas alteraciones y de la duración de la intervención dietaria, la alimentación con CAF no alteró el metabolismo de la glucosa en ninguno de los períodos de dieta estudiados, como

así tampoco generó síndrome metabólico. Éstos resultados son dicotómicos ya que, al igual que nosotros, algunos autores reportaron que una ingesta prolongada de CAF no afecta el metabolismo de la glucosa [179,177,199,200,189], ni provoca síndrome metabólico [199,179,200], mientras que otros autores han reportado que una alimentación con CAF desde el destete altera el metabolismo de la glucosa y provoca síndrome metabólico [136,180]. Estas diferencias pueden deberse a que en los distintos estudios difirieron las cepas de rata, el sexo y edad de inicio de la intervención dietaria de las mismas, al igual que la composición de la dieta. Respecto a este último punto, algunos autores en vez de alimento balanceado regular utilizan alimento balanceado enriquecido con grasa o mezclado con distintos alimentos de alta palatabilidad formando un bolo, sin proporcionarles al animal la posibilidad de elegir [180].

- ***La dieta CAF altera los circuitos cerebrales homeostáticos de control de ingesta.***

Los animales alimentados con CAF incrementaron la ingesta energética a lo largo de toda la intervención dietaria, sin embargo los mecanismos homeostáticos de regulación estudiados no se vieron afectados en el **corto plazo**. En este sentido, Castro y col. [59] reportaron que una ingesta durante 2 semanas de dieta CAF en ratas macho en edad temprana no produjeron cambios en la expresión de *Pomc* ni *Npy* en hipotálamo completo. Puesto que la alimentación está influenciada por el placer y los alimentos altamente sabrosos podrían activar el sistema de recompensa cerebral a pesar de una ingesta energética suficiente, la ausencia de cambios en el sistema homeostático neuropeptídico de los animales alimentados con CAF a corto plazo nos indicaría que la mayor ingesta energética observada en estos animales podría deberse a la acción de una vía no homeostática. De este modo, tal como se discutirá más adelante, proponemos que otro sistema, como el sistema mesolímbico cerebral, actuaría a corto plazo, conduciendo el exceso en la ingesta energética y contribuyendo al desarrollo de la obesidad a largo plazo.

El eje hipotálamo-tejido adiposo contribuye en gran medida al control de la ingesta de alimentos [201], principalmente a través de la leptina circulante. Esta hormona promueve un balance energético negativo a nivel cerebral, principalmente en ARC, ejerciendo su efecto al unirse y activar al ObRb, inhibiendo a las neuronas NPY/AgRP y activando a las POMC, resultando en una reducción de la ingesta de alimentos [37]. La interrupción de esta acción conduce a un estado conocido como resistencia a la leptina, que se caracteriza por respuestas a la leptina alteradas y una reducción de la expresión y/o de los niveles de proteína de *Obrb* [202]. En el presente estudio, las ratas alimentadas con CAF a **mediano plazo** desarrollaron hiperleptinemia, pero la sensibilidad a la hormona en ARC podría no verse afectada según el incremento en la expresión de *Obrb* y *Pomc* observados en el mediano plazo. El incremento en los niveles de *Pomc* es consistente con un estudio publicado por Kinzig et al [203], quien observó que luego de 8 semanas en una dieta alta en grasas, las ratas macho aumentaron el ARNm de *Pomc* en ARC. Además, en el largo plazo los niveles de expresión de *Agrp* en ARC de hembras alimentadas con CAF disminuyeron a la mitad, probablemente en un intento por limitar el

consumo de energía y el aumento de peso excesivo. Sin embargo, esta respuesta anorexígena del ARC no fue suficiente para mantener la ingesta de energía en valores regulares, lo que sugiere que mecanismos hipotalámicos adicionales estarían actuando para contrarrestarla. De esta manera, otros núcleos hipotalámicos como el HL (a través del aumento de *Ox*), PVN (con su mayor expresión de *Npy* y *Agrp*) y VMN (con el incremento de *Agrp*) generan una señal orexígena que estaría mediando el alto consumo de energía observado en el mediano y largo plazo. Postulamos que la contribución orexígena de *Ox* en HL sería la más importante y la principal encargada de conducir el incremento en la ingesta energética observado en los animales CAF, ya que la producción de neuropéptidos en PVN y VMN es menor que en ARC. Ha sido reportado que la sobreexpresión de *Npy* en PVN induce obesidad a través de un incremento en la ingesta de alimentos [204]. En este sentido, se ha encontrado mayor expresión de *Npy* en PVN de ratas macho alimentadas con una dieta de alta palatabilidad durante 8 semanas [205]. Además, se han encontrado mayores niveles de *Npy* y *Agrp* en PVN de animales genéticamente obesos, como ratas Zucker *fa/fa*, y ratones *db/db* y *ob/ob* [206-208]. Conjuntamente, ha sido reportado que el NPY no sólo estimula la ingesta de alimentos, sino que tiene un efecto preferencial sobre la ingesta de azúcares [209-211] y/o grasas [211-213]. De esta manera, la mayor preferencia por los alimentos dulces manifestada por los animales CAF en el mediano y largo plazo podría deberse a la mayor expresión de este neuropéptido. Por otro lado, el incremento en los niveles de ARNm de *Ox* en HL podría responder a los altos niveles de leptina circulantes, ya que se ha reportado que esta hormona promueve el aumento de la expresión de *Ox* [214], aunque se encontraron alteraciones en los niveles de *Obrb* en el HL de las hembras alimentadas con dieta CAF. En este sentido, resulta importante distinguir que en el HL se han registrado al menos tres poblaciones neuronales cada una de las cuales tiene patrones de expresión moleculares diferentes [215]. Mientras que las neuronas OX no expresan *Obrb*, muchas de las neuronas circundantes lo hacen, siendo la regulación de las mismas a través de determinadas poblaciones del HL que expresan el receptor, así como las poblaciones hipotalámicas del ARC [214]. Por su parte, ha sido reportado que la leptina tiene un rol clave sobre la actividad eléctrica de estas neuronas OX, ya que indirectamente las inhibe logrando la hiperpolarización de sus membranas [214]. No obstante, se ha observado que el aumento en los niveles de leptina promueve un incremento en la expresión génica de *Ox* en dichas neuronas, lo cual se sugiere sería mediado a través de las poblaciones neuronales adyacentes, aunque la naturaleza del neurotransmisor se desconoce aún [214,216]. Estos efectos que parecen un tanto antagónicos, se vinculan con la regulación rápida que se da luego de una comida (inactivación eléctrica), y con un estado persistente que se espera promovería los efectos crónicos de las OX, como es el gasto energético en el largo plazo [216]. Además, las OX también impulsan la ingesta hedónica de alimentos de alta palatabilidad y tienen un rol crítico en las adicciones, mediando tanto el comportamiento hacia los alimentos como el consumo en situaciones de alta motivación y recompensa [214,217], lo que sugiere que el

incremento en la expresión de *Ox* en hembras CAF en el mediano y largo plazo podría estar más relacionado con su papel en la alimentación hedónica que en el sistema homeostático [214]. En el **largo plazo**, los sistemas neuropeptídicos del hipotálamo continuaron desregulándose, al incrementarse los cambios observados en el mediano plazo: la expresión de *Agrp* aumentó en PVN, reforzando la respuesta orexígena de este núcleo, y disminuyó en ARC, aumentando la tendencia anorexígena de este último, lo que nos indicaría que este neuropéptido es relevante en la exposición prolongada a la dieta CAF. En conjunto, estos cambios podrían explicar el hecho que la ingesta energética diaria de los animales alimentados con CAF aumentó casi 3 veces en relación a los C de mediano a largo plazo, mucho más allá de sus necesidades metabólicas. Estos datos nos permiten suponer que, a mediano y largo plazo, la señal orexígena observada en el HL, PVN y VMN de hembras alimentadas con CAF lideró el aumento en la ingesta de energía, provocando el sobrepeso y la obesidad. Sin embargo, en ambos momentos, ARC presentó una tendencia anorexígena, probablemente en un intento de proteger a los animales contra la ingesta de alimentos no controlada y los trastornos metabólicos consiguientes.

Con el fin de investigar los mecanismos moleculares involucrados en los cambios de expresión génica encontrados, se analizó el patrón de metilación de los promotores de los genes *Pomc* y *Npy* en el corto, mediano y largo plazo, ya que ha sido propuesto que el estado de metilación de estos genes es crítico para la regulación de la ingesta de alimentos y del peso corporal [218,219]. Se ha demostrado que la expresión de *Pomc* está fuertemente influenciada por el estado de metilación de su promotor en diferentes tejidos, siendo particularmente sensible a las condiciones nutricionales en el hipotálamo [219]. En el **mediano plazo**, en ARC de animales alimentados con CAF se encontraron menores niveles de metilación en un sitio *Mae II* del promotor de *Pomc*, adyacente a un potencial sitio de unión para el factor de transcripción STAT3, cambio que se mantuvo en el largo plazo. STAT3 es fundamental para mediar los efectos genómicos de la leptina, al regular la expresión génica de *Pomc* en el hipotálamo [220]. Además, en respuesta a la señalización de leptina, fosfo-STAT3 activa el promotor *Pomc* a través de un mecanismo que requiere un sitio de unión a Sp1 [221]. Por tanto, la disminución del patrón de metilación del promotor *Pomc* en este punto podría permitir la unión del factor fosfo-STAT3 y la consecuente acción de la leptina sobre las neuronas *Pomc* de ARC, desencadenando así la activación del promotor y el subsiguiente incremento en la expresión del ARNm del *Pomc*. Los cambios encontrados en el patrón de metilación del promotor *Pomc* podrían explicar, al menos en parte, el aumento en los niveles de ARNm de *Pomc* en ARC de animales alimentados con CAF a mediano y largo plazo, y son consistentes con el incremento en la expresión de *Obrb* como consecuencia de los mayores niveles de leptina circulante. Además, este sitio de *Mae II* es un potencial sitio de unión para el factor de transcripción negativo del elemento sensible a glucocorticoides (nGRE), un elemento del ADN necesario para la represión glucocorticoide del gen *Pomc* [213]. Una disminución en el patrón de metilación en este sitio podría llevar a una

expresión de *Pomc* disminuida; sin embargo, esto no se observó. Otros autores encontraron un estado de metilación más bajo de este sitio en animales sobrealimentados, lo que indica una posible correlación entre los cambios observados en los diferentes modelos de obesidad [214,129]. Sin embargo, debido a las limitaciones de la técnica utilizada, algunos sitios de CG dirigidos a la metilación no se incluyeron en el análisis del promotor *Pomc*; por ejemplo, el sitio de unión Sp1, que se informó que es esencial para la mediación de los efectos de la leptina en la expresión de *Pomc* [212]. Aunque los potenciadores nPE1 y nPE2 también están involucrados en dirigir la expresión génica a neuronas hipotalámicas *Pomc*, no se encontraron diferencias en el patrón de metilación de ratas alimentadas con CAF en ninguno de los puntos temporales estudiados, como informaron otros autores [39]. Por otro lado, ha sido reportado que el estado de metilación del promotor *Npy* era sensible a las condiciones de alimentación [218,222]. En línea con esto, se encontró una disminución en el patrón de metilación del promotor *Npy* en PVN, tanto en el mediano como en el largo plazo, en dos sitios *BstUI* adyacentes a un potencial sitio de unión para el factor de transcripción AP-2 α , el cual es muy importante para la promoción de la transcripción de genes NPY en el hipotálamo [223]. Por lo tanto, la desmetilación en un sitio adyacente podría modificar la capacidad de este factor de transcripción para unirse al promotor y contribuir así al aumento en la expresión de *Npy* en PVN. Esto es consistente con los resultados obtenidos por otros autores [222], los cuales informaron una disminución en el grado de metilación para el promotor *Npy* en el hipotálamo de ratas hembra adultas bajo una dieta alta en carbohidratos. Los cambios en el patrón de metilación de los promotores de *Pomc* y *Npy* proporcionan evidencia de una regulación transcripcional por mecanismos epigenéticos dependientes de la dieta, que contribuirían al desarrollo del sobrepeso y la obesidad al alimentarse los animales con una dieta de alta palatabilidad como la CAF.

- ***Efecto de la duración de la intervención dietaria sobre el sistema homeostático de control de ingesta.***

La expresión hipotalámica de los genes que codifican los neuropéptidos involucrados en el control de la ingesta se vio afectada por la duración de la intervención dietaria [224]. Así, el período de alimentación afectó de forma diferencial los niveles de ARNm de los neuropéptidos, tanto en hembras alimentadas con dieta C como CAF. La expresión de *Npy* y *Cart* disminuyó con el tiempo en ARC, PVN y VMN, tal como fuese informado por otros autores [225,226]. Además, a partir de las 11 semanas de dieta, los niveles de *Pomc* cayeron en PVN y la expresión de *Agrp* aumentó en ARC [227]. Estos cambios, principalmente orexígenos estuvieron en línea con el mayor consumo diario de energía que presentaron los animales alimentados con alimento balanceado a las 11 semanas y en las semanas posteriores, en comparación con los animales C a las 4 semanas. Además, la duración de la intervención dietaria disminuyó la expresión de *Obrb* en PVN, VMN y HL, pero no en ARC, tal como fuese reportado [228]. En este sentido, se ha informado que los efectos anorexígenos centrales de la leptina dependen de la edad y que los

animales adultos mayores desarrollan resistencia a la leptina de forma natural [229,228]. Nuestros resultados podrían sugerir que los animales alimentados durante 20 semanas con alimento balanceado presentarían una resistencia incipiente a la leptina en PVN, VMN y HL. Esto se relaciona a la disminución en la expresión de *Obrb* y el aumento de los niveles de leptina circulantes (a pesar de que estos no fueron estadísticamente significativos). Sin embargo, esta hipótesis debería corroborarse con estudios futuros, por ejemplo mediante determinación de la fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT3) y la medición de la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3), fundamentales en la señalización de *Obrb* y mediadores de la resistencia central a la leptina [230].

- ***Efecto de la dieta CAF sobre el sistema de recompensa cerebral.***

Los **circuitos dopaminérgicos** desempeñan un papel fundamental en la activación de la recompensa mediada por los alimentos. Se ha reportado que alteraciones en los mismos pueden contribuir a una mayor susceptibilidad a la obesidad [193]. Los animales alimentados durante un **corto plazo** con dieta CAF presentaron, en ausencia de sobrepeso y cambios en los niveles de insulina y leptina, un estado hipodopaminérgico del sistema mesolímbico, reflejado a través de un aumento en la expresión de *Dat* en ATV y una disminución en el nivel de expresión de *Drd2* en NAcSh. Esto podría estar vinculado con un mayor consumo de comida palatable como un modo de compensar esta hiposensibilidad a la recompensa [188,132]. Dado que al aumentar dichos umbrales es necesario consumir cada vez más cantidad del estímulo para alcanzar el nivel de placer mínimo, esta hiposensibilidad de recompensa inducida por la dieta puede tener un papel fisiopatológico en el desarrollo de la obesidad al aumentar la motivación para consumir alimentos ricos en grasas y/o azúcares de alta recompensa [188]. Por otra parte, estudios en humanos han demostrado que la actividad *Drd2* de individuos obesos resulta disminuida en respuesta a comidas de alta palatabilidad, e inclusive se la ha correlacionado con el aumento del índice de masa corporal [66,231]. El hallazgo de un polimorfismo en una variante alélica de *Drd2* vinculada a esta disminución con alta prevalencia entre los individuos obesos, ha estrechado la relación existente entre la obesidad y la regulación de este gen, destacándolo como un factor que favorece el desarrollo de dicho trastorno [232,233,66,234]. Se ha propuesto también que junto con otros desordenes de tipo compulsivo, como la adicción a las drogas, reflejan un “síndrome de deficiencia de recompensa” cuya causa sería, al menos en parte, esta reducción en los niveles de *Drd2* [66,231]. De este modo la disminución en la sensibilidad del circuito de recompensa sería una respuesta para enfrentar la sobreestimulación palatable, desencadenando alteraciones que acabarían llevando al sobrepeso [188,235,66]. Paradójicamente, la dieta CAF produjo un incremento en la expresión de *Drd1* en NAcC, contradiciendo lo que han reportado otros autores [184,132]. Sin embargo la mayoría de ellos han estudiado la expresión de *Drd1* en NAc sin distinguir entre sus regiones. Es importante destacar que, aunque los receptores *Drd1* y *Drd2* tienen un efecto opuesto a nivel molecular, a menudo actúan de forma sinérgica [236]. Ha sido

reportado que altas concentraciones de DA incrementan los niveles de expresión de *Drd1* [237], por lo que este incremento en los niveles de *Drd1* en NAcC podría estar actuando como mecanismo compensatorio a la baja de *Drd2* en NAcSh. Si bien se desconoce la arquitectura precisa de estos núcleos, se ha demostrado que la DA tiene múltiples y complementarios roles según el circuito, permitiéndole así al animal optimizar los comportamientos gratificantes [64]. Por su parte, NAcSh tiene una función integradora entre el valor de motivación y la novedad del estímulo, creando así la motivación por el resultado. En cambio, en NAcC la DA provee un valor de motivación genérico asociado a una posible recompensa que permite traducirla luego en acciones concretas, llevando al desarrollo de conductas motivadas [57,238,75]. Por otro lado, dado que las neuronas *Drd1* del NAc influyen sobre la actividad GABAérgica del ATV [59], este aumento en la expresión del receptor podría estar vinculado a las alteraciones observadas en ATV. Por todo lo antes mencionado, al estar el NAcC y la señalización a través de *Drd1* en dicho núcleo vinculados al aprendizaje y desarrollo de respuestas hacia el alimento [238,75], podríamos suponer que este aumento en su expresión permite sentar las bases que llevan a la alteración del patrón de alimentación. Por otra parte, se ha visto que el bloqueo de la señalización por *Drd1* afecta la preferencia por los azúcares, reforzando el rol de este receptor en la asociación con un incentivo [239]. Además, se ha resaltado que la activación de CeA es crítica al momento de la adquisición de una conducta [240], ya que su modulación puede crear una señalización negativa que no solo afecte la motivación por el estímulo sino que altere el valor hedónico asociado a esa recompensa [241]. Entonces, dada su influencia sobre la valoración de un estímulo, así como su rol en las etapas iniciales del aprendizaje asociativo, podríamos suponer que la disminución en *Drd1* observada en CeA contribuye al estado hipodopaminérgico, permitiendo generar alteraciones en la preferencia hacia los alimentos y el patrón de alimentación.

Otro marcador de una alteración en el funcionamiento del sistema mesolímbico es la disminución de la expresión de *Gad1* y *Gad2* en ATV. Numerosos trabajos han reportado una menor actividad en las neuronas GABAérgicas frente a diferentes estímulos gratificantes, y aunque representan alrededor del 40% de las neuronas del ATV, su participación en la inhibición de las neuronas dopaminérgicas resulta de gran importancia [69,242]. En concordancia con nuestros resultados, estudios utilizando animales obesos han observado una menor actividad GABAérgica en ATV [242,243]. Esto resulta relevante, ya que dichas neuronas hacen sinapsis tanto sobre las dendritas como los cuerpos neuronales dopaminérgicos [244], permitiéndole de este modo generar resultados “escalonados” mediante la combinación de diferentes *inputs* [69]. Dicha inhibición se ha observado de manera sostenida en algunos comportamientos de adicción a drogas, resultando en una modificación del tono dopaminérgico en el largo plazo [245,246]. Por otro lado, la expresión de *Gad1* y *Gad2* en ATV responde a *inputs* GABAérgicos provenientes de otros núcleos, como NAc y VP, los cuales a su vez son inervados por las neuronas del ATV [247,58]. Considerando entonces todos los posibles *inputs* neuronales que pueden afectar la

expresión de *Gad1* y *Gad2*, se podría interpretar esta modificación en la expresión como un modo de contribuir a la modulación del tono dopaminérgico en ATV. Por otro lado, en el corto plazo, la dieta CAF duplicó los niveles de expresión de *Gad2* en VP. Se ha reportado que el mayor *input* inhibitorio GABAérgico que recibe el ATV proviene del VP [247], además del *feedback* proveniente de la activación del NAc. Si bien las proyecciones del NAc tienen como blanco principal las neuronas no-dopaminérgicas [248], el VP impacta tanto en las poblaciones dopaminérgicas como GABAérgicas del ATV [249]. A su vez, los cambios producidos en las neuronas GABAérgicas del ATV pueden afectar la producción de GABA por VP [55]. De este modo la dieta CAF habría afectado la síntesis de GABA en VP, lo que podría contribuir a desinhibir las neuronas dopaminérgicas al disminuir indirectamente la expresión de *Gad1* y *Gad2* en ATV. Todos estos cambios observados en las ratas alimentadas con CAF en el corto plazo son revertidos en el **mediano y largo plazo**, indicando que el sistema dopaminérgico se estabilizaría, dado por una regularización en la expresión de *Drd1*, *Drd2*, *Dat* y de *Gad1* y *Gad2*.

De todos los cambios en la expresión génica encontrados en el sistema dopaminérgico mesolímbico en el **corto plazo**, sólo el incremento en los niveles de *Dat* en ATV de hembras CAF estuvo relacionado con una disminución en el patrón de metilación del sitio *Mae II* del ADN. En este sentido, ha sido reportado que la ingesta de una dieta rica en grasa desde el destete en ratones se relacionó a menores niveles de metilación del promotor de *Dat*[250]. Estos datos podrían identificar la metilación diferencial del ADN como un vínculo mecánico entre el consumo de una dieta CAF y los cambios resultantes en la expresión de genes relacionados con la DA tales como *Dat*.

Por otra parte, y atendiendo a la disminución en la expresión de *Mor* hallada en NAcSh y VP en el **corto plazo**, algunos autores sugieren que la exposición a una dieta palatable *ad libitum* altera su expresión [184,189,132]. En este sentido se ha propuesto que la reducción en su transcripción podría ser un modo de responder a un incremento en la síntesis y liberación de opioides endógenos, asociados a la ingesta de comidas de alta palatabilidad [189]. Esto resulta curioso ya que tanto NAc como VP producen opioides, si bien la medición de su síntesis escapa a los objetivos de la presente Tesis. Más aun, algunos autores han detectado pequeños “puntos hedónicos calientes” dentro del VP y del NAcSh donde los opioides estimulan el “gusto” por los alimentos placenteros, mientras que otros “puntos fríos” donde los opioides suprimen el impacto hedónico positivo, generando entonces su estimulación un comportamiento diferente [13]. Podríamos hipotetizar entonces, que la disminución de *Mor* en NAcSh y VP sería un mecanismo adicional a la hiposensibilidad dopaminérgica por el cual se estaría disminuyendo la función del sistema de recompensa en respuesta a la palatabilidad en el corto plazo. A su vez, ha sido propuesto que el impacto hedónico positivo del sabor dulce está mediado por incrementos en los receptores MOR en NAcSh [251]. De esta manera, la disminución en la expresión de *Mor* encontrada en NAcSh de los animales CAF en el corto plazo podría estar mediando la mayor

elección de los alimentos salados por sobre los dulces observada en las hembras CAF4. La disminución en la expresión de *Mor* hallada en NAcSh en el corto plazo se pronunció aún más en el **mediano plazo**. En este sentido, algunos autores sugieren que la exposición *ad libitum* a una dieta palatable podría contribuir a reducir esta sensibilidad a los opioides. Esto se vería acentuado por el tiempo de administración de la misma, resultando fisiológicamente relevante para la regulación de la homeostasis energética en el largo plazo y su consecuente impacto sobre el peso corporal [184,189]. En ratones genéticamente obesos (*ob/ob*) también se ha encontrado una desregulación de la expresión de *Mor*[87], proponiéndose que la misma podría ser un mecanismo adicional para disminuir el funcionamiento del sistema de recompensa en los animales obesos [132]. Se ha sugerido que las señales provenientes del tejido adiposo, como por ejemplo la leptina, y los efectos de la dieta podrían contribuir sinérgicamente a las alteraciones en su expresión, aumentando la vulnerabilidad a la ganancia de peso [132,252]. Paradójicamente, la expresión de *Mor* en BLA resultó incrementada en un 60%, hecho que además se vio acompañado por un aumento en la expresión de *Obrb* y *Ghsr*. El aumento de *Mor* resulta sorprendente ya que se ha observado una regulación recíproca de su expresión en BLA según el estado energético [253]. Sin embargo, existe una diferencia en el comportamiento hacia la comida palatable respecto de VP o NAcSh, pues en dichos núcleos la señalización opioide está vinculada al efecto hedónico, mientras que en BLA se asocia al valor del incentivo [254]. En este sentido, se ha demostrado una mayor expresión de *Mor* en BLA de animales obesos, lo que permitió correlacionarlo con el aumento observado en los niveles séricos de leptina [253]. A su vez, se ha reportado que los efectos de la señalización de OX dependen en cierta medida de la activación del sistema opioide [255], y dado que BLA envía proyecciones al HL[75,256] se ha propuesto que dicha interacción sería importante para motivar el consumo voluntario de alimentos [257]. Por otra parte, el tratamiento con ghrelina en humanos ha aumentado la puntuación del nivel de hambre en función de la activación de la amígdala, sugiriendo que el incremento de la motivación por la comida mediado por ghrelina estaría fuertemente vinculado a esta región [258]. A partir de lo observado y considerando que BLA se activa frente a respuestas voluntarias, podemos suponer que esta señalización de opioides en BLA estaría implicada en la transmisión de las propiedades “afectivas” del alimento modulando el valor de recompensa de la comida [254]. Lo cual, sumado al aumento en la señalización de leptina y ghrelina contribuiría a influir sobre la efectividad de la señalización de OX que estaría motivando la ingesta. Sin embargo, pese a que los niveles de adiposidad y de leptina circulante son mayores, en el **largo plazo** este sistema se restablece, lo que podría indicarnos que el incremento en la ingesta energética de los animales CAF se debería principalmente al sistema homeostático.

La disminución en la expresión de *Hcrtr1* en AVT encontrada en el **corto plazo** podría actuar como mediadora de la disminución de *Mor* hallada en NAcSh. En este sentido, ha sido reportado que el bloqueo de la señalización de OX dentro del ATV atenúa el comportamiento de

alimentación impulsado por opioides [217]. Por otro lado, en el **mediano plazo** el incremento en los niveles de expresión de *Ox* tiene como consecuencia una disminución de la expresión de los receptores *Hcrtr1* y *Hcrtr2* presentes en NAcSh. Este núcleo, si bien no se ha reportado como el blanco principal de las OX, recibe *inputs* de dichas neuronas y se lo vincula a una ingesta basada en la recompensa en condiciones de saciedad [259], dado que a su vez envía proyecciones inhibitorias a las neuronas GABAérgicas del HL [79]. Proponemos entonces que, al disminuir la expresión de los receptores de OX en NAcSh, se estaría contribuyendo a promover la ingesta aún en condiciones de saciedad. A su vez, hay evidencia de que una ingesta prolongada de dietas ricas en azúcares, tal como es el caso de la dieta CAF, disminuye la activación neuronal en el NacSh mientras que activa a las neuronas OX del HL, donde VP actuaría como modulador [260]. El VP recibe proyecciones de OX del HL. En este sentido, ha sido reportado que una microinyección de OX en VP incrementa el impacto hedónico de la sacarosa, incentivando al mayor consumo de la misma [261]. De esta manera, el incremento en la expresión del *Hcrtr1* observado en VP de animales alimentados con CAF en el **largo plazo** estaría estimulado por el incremento en los niveles de *Ox* en HL y podría estar incentivando, al menos en parte, la mayor ingesta de alimentos dulces observada en los animales CAF20. Por último, algunos autores indican que la activación de neuronas OX, y particularmente su posterior señalización a través de su receptor HCRTR1 en ATV, incentivan la ingesta de alimentos de alta palatabilidad [217]. Así, el incremento de *Hcrtr1* en ATV de hembras CAF en el largo plazo, podría estar mediando, probablemente de manera parcial, el incremento en la ingesta de alimentos palatables por sobre el alimento balanceado en este punto de la intervención dietaria.

La amígdala tiene un papel crítico en los efectos motivacionales y las propiedades de refuerzo de las sustancias de abuso. En particular, CeA está implicado en las respuestas conductuales y fisiológicas asociadas con el consumo de estas sustancias, entre las que se encuentra la comida palatable [262]. Ha sido reportado que la activación de *Ghsr* en CeA media los efectos placenteros de las sustancias de abuso [262]. De esta forma, la disminución observada en el **corto plazo** de *Ghsr* en CeA estaría representando otra forma de inactivación del sistema de recompensa, el cual podría estar mediando el incremento en la ingesta de alimentos de alta palatabilidad observada en los animales CAF como mecanismo compensatorio. En concordancia con el aumento de los tejidos adiposos y el incremento de la leptina circulante, se observó un aumento en la expresión de su receptor en ATV en animales alimentados con CAF en el **mediano plazo**. La presencia de este receptor en diferentes poblaciones neuronales del mesencéfalo sugiere un potencial rol como punto de conexión entre las señales metabólicas periféricas y los circuitos neuronales que regulan la ingesta [263]. En este sentido, numerosos estudios han reportado que la leptina modula tanto las neuronas del hipotálamo como las del sistema de recompensa para promover la saciedad, suprimiendo de este modo el valor de incentivo asociado a cada alimento [264]. Sin embargo, las consecuencias de los impulsos neuronales, la actividad enzimática y la

concentración de DA generada escapan a los resultados de esta Tesis, dado que sólo se planteó como objetivo la determinación de los niveles de expresión génica. El *Obrb* se expresa en la amígdala, especialmente en BLA [265], que a su vez que actúa como un regulador del peso y de la ingesta. Ha sido reportado que el un incremento en la expresión de *Obrb* en BLA, independientemente del incremento de leptina circulante, estaría mediando la formación y el mantenimiento de conductas hacia la comida, tanto gustosas como aversivas [265]. Por otra parte, también ha sido reportado que los niveles de leptina están relacionados de forma directa con la preferencia por el gusto dulce [266]. De esta manera el aumento de *Obrb* observado en BLA de hembras CAF en conjunto con los mayores niveles de leptina circulantes tanto en el **mediano como largo plazo** podría estar influyendo en la mayor elección de los animales por la comida de alta palatabilidad, especialmente por aquellas de gusto dulce.

Pese a las desregulaciones observadas en el sistema de recompensa, a partir del análisis del **comportamiento hedónico hacia el alimento** de los animales CAF en el **corto plazo** se pudo observar un menor consumo de las soluciones ofrecidas a lo largo de todo el TSSS, independientemente de la solución ingerida. Esto podría deberse a que la dieta CAF presenta una mayor cantidad de humedad respecto del alimento balanceado que ingieren los animales del grupo C. Por otra parte, se observó que la presencia del sabor dulce de la sacarosa no condiciona la elección del animal, lo cual resultó ser independiente de la dieta administrada. En cuanto al análisis de preferencias, se distinguió que los animales alimentados con dieta CAF demostraron una preferencia hacia la solución que representa la “novedad” con respecto al consumo de la solución conocida. Dada la amplia variedad de alimentos palatables que componen el modelo de dieta CAF y el esquema de rotación de los mismos se garantiza la variedad sin producir acostumbramiento, estimulando en forma constante la ingesta. En este sentido, ha sido reportado que la variedad en la dieta estimula la ingesta de comidas nuevas constantemente, lo cual se denomina “efecto buffet”, y que involucraría al sistema mesolímbico en la motivación por este comportamiento [94]. Por otro lado, la dieta CAF tuvo un mayor impacto sobre el consumo de la solución conocida, disminuyendo su ingesta respecto del grupo C. De este modo el animal responde ante lo “conocido” teniendo en cuenta lo ocurrido en el momento previo, es decir durante la pre-exposición. A su vez, esta disminución en la respuesta hacia lo conocido podría vincularse a las alteraciones observadas en el sistema dopaminérgico, particularmente aquellas que involucran a la región de la amígdala, dado que la misma integra los factores sensoriales y de saciedad en la regulación de la ingesta [267]. Así, aunque los volúmenes ingeridos por las hembras CAF fueron menores respecto de las C, un consumo de 6-7 ml durante la pre-exposición es suficiente para evocar la saciedad sensorial específica en los animales alimentados con dieta CAF, mostrando una preferencia hacia el sabor novedoso. En contraste con lo mencionado, la ingesta de dieta CAF a **mediano plazo** no afectó el consumo a lo largo del TSSS. Si bien durante la familiarización se vio un efecto de la dieta CAF marcando una mayor inclinación hacia la

maltodextrina, este no es robusto y contundente, dado que se revierte durante el *choice test*, presentando una mayor preferencia por el sabor dulce de la sacarosa. Respecto al análisis de la preferencia, se pudo observar que la pre-exposición no genera cambios en la saciedad, lo cual se ha propuesto estaría vinculado a una insensibilización a las propiedades motivadoras del alimento en el mediano y largo plazo, pese a su variedad [268,269]. Además, considerando el estado de sobrepeso y el incremento en la concentración de leptina hallados, podemos suponer que estos factores han influido sobre la respuesta de las ratas alimentadas con dieta CAF a la novedad, haciendo que se deje de observar lo ocurrido en el corto plazo.

Ha sido reportado que la ingesta de alimentos de alta palatabilidad afecta la **actividad locomotora y exploratoria**[198,136]. Los animales alimentados con CAF tanto en el **corto, mediano como largo plazo** incrementaron su actividad exploratoria y disminuyeron sus niveles de ansiedad, dado por el incremento en el número de veces que el animal se paró en dos patas y el menor número de bolos fecales realizados en el campo abierto. En línea con nuestros resultados, Lalanza y col. [136] hallaron que la administración de dieta CAF a hembras por un largo plazo aumenta el comportamiento exploratorio y tiene un fuerte efecto anti-ansiedad. Planteamos que la disminución en los niveles de ansiedad observada en el mediano y largo plazo podría deberse a los mayores niveles de *Npy* encontrados en el núcleo PVN, dado que ha sido reportado que la expresión de *Npy* en hipotálamo sería inversamente proporcional a los niveles de ansiedad [198]. Sin embargo, también ha sido reportado que esta dieta disminuye la actividad locomotora [136], generalmente debido a un excesivo peso corporal, pero esto no fue observado para ninguno de los tiempos estudiados, pese al incremento de peso de los animales CAF. La activación de *Drd1* como *Drd2* tanto en NAcC y NAcSh promueve la locomoción [237]. En el corto plazo, el incremento de *Drd1* en NAcC (que se esperaría que lleve a una mayor actividad locomotora), estaría contrarrestado por la disminución de *Drd2* en NAcSh, pudiendo ser, consecuentemente el motivo por el cual no cambia la actividad locomotora, al igual que en el mediano y largo plazo, donde no se encuentran cambios en la vía dopaminérgica mesolímbica.

Debido a que el juego social es una recompensa natural, se esperaría que la comida palatable lo incremente, al activar al sistema de recompensa cerebral [98]. Ha sido reportado que el tratamiento con antagonistas de los receptores de DA reducen el juego social [98,270], de este modo, los mayores niveles de evasión presentados por las hembras CAF en el **corto plazo** podrían relacionarse con el estado hipodopaminérgico mesolímbico encontrado, dado que en el **mediano y largo plazo** este circuito se estabiliza como así también los niveles de evasión de los animales. Cabe aclarar que este resultado, indicativo de que las hembras alimentadas con CAF en el corto plazo presentan mayores niveles de ansiedad, es en parte dicotómico con el encontrado en el test de locomoción.

- ***Efecto de la longitud dietaria sobre la expresión de los distintos componentes del sistema de recompensa.***

La expresión mesolímbica de la mayoría los genes que codifican para las distintas moléculas involucradas en las vías dopaminérgicas del sistema de recompensa cerebral fue afectada por la duración de la intervención dietaria [271]. Así, se encontró una disminución de los niveles de ARNm de *Th*, *Drd2* y *Dat* en ATV y NAc, tanto en hembras alimentadas con dieta C como CAF. Estos cambios estuvieron en línea con lo reportado por varios autores, que indican que la expresión de moléculas del sistema dopaminérgico se altera con la edad [272,273]. Estos cambios podrían traer aparejada una menor sensación de recompensa, tanto en animales C como CAF, provocando un incremento de la ingesta de comida como modo de recompensa natural. Estos resultados estarían en línea con la disminución de la expresión de *Gad1* y *Gad2* con la duración de la intervención dietaria en ATV de animales C y CAF, lo que podría indicarnos una menor inhibición de las neuronas dopaminérgicas, a modo de efecto compensatorio por esta hiposensibilidad a la recompensa.

- ***La dieta CAF altera la expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas y de los receptores hormonales esteroides.***

Las ratas alcanzan su madurez sexual entre los 40 y 60 días de edad [274]. Dado que no todas las hembras sacrificadas a las 4 semanas de dieta presentaron ciclos estrales regulares, los resultados obtenidos en el **corto plazo** podrían no deberse exclusivamente a la dieta.

Los estrógenos y sus receptores desempeñan un papel fundamental en el control de la homeostasis energética y del metabolismo de la glucosa. Las acciones de los estrógenos en los núcleos hipotalámicos controlan diferencialmente la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la distribución del tejido adiposo blanco. Los efectos de E_2 en el balance de energía están mediados principalmente por $RE\alpha$. El aumento de la señalización de $RE\alpha$ suprime el consumo y aumenta el gasto de energía [121]. El *Rea* se expresa ampliamente en varios núcleos hipotalámicos, como ARC, VMN y PVN. Particularmente, en ARC, se expresa principalmente en las neuronas POMC, donde se producen la mayoría de las acciones de los estrógenos en la ingesta de alimentos [120]. De hecho, ha sido reportado que la eliminación del *Rea* en las neuronas POMC de ratones conduce a hiperfagia, sin influir de forma directa en el gasto de energía o en la distribución del tejido adiposo [121]. Por lo tanto, en ARC de ratas alimentadas con CAF, la respuesta anorexígena mediada por POMC podría verse incrementada por el aumento en la expresión del ARNm de *Rea* en el **largo plazo**, incitando a restringir el aumento exacerbado en la ingesta de alimentos. Además, $RE\alpha$ y $ObRb$ colocalizan en las neuronas POMC [119], de esta forma el incremento en la expresión de estos receptores podría indicar que la señalización del estrógeno también potencia la sensibilidad a la leptina [275]. Los niveles de E_2 en el cerebro femenino dependen de los niveles circulantes de esta hormona y de la neurosteroidogénesis *de novo* [276]. ARO es la enzima responsable de la conversión de testosterona en E_2 . En este sentido, se ha

informado de los ratones con alteración genética de ARO (ArKO) desarrollan obesidad [277]. En el **mediano plazo** la dieta CAF duplicó los niveles de expresión de *Aro* en VMN, cambio que se mantiene en el **largo plazo** y se suma un gran incremento de la expresión también en PVN, lo que podría conducir a una mayor síntesis de E_2 y una acción anoréxica posterior [278]. A su vez, ha sido reportado que, en hipotálamo, *Rea* coexpresa con *Aro*, sugiriéndose que la señalización de ARO a través de estrógenos cerebrales sintetizados localmente podrían mediar los efectos biológicos activando los receptores $ER\alpha$ y β pre y post-sinápticos [279]. También se ha reportado una importante acción estrogénica tanto autócrina como parácrina [279], lo que podría indicarnos que la mayor producción de E_2 de los núcleos VMN y PVN estaría impactando en ARC, aumentando la expresión de su receptor *Rea*. A nivel proteico, se vio una alta expresión de *Rea* en ARC y VMN, evidenciándose a nivel nuclear [279] y una menor expresión en PVN. Por su parte, ARO se observó en neuronas [280], tanto en los núcleos PVN, VMN como ARC, particularmente expresada en citoplasma con un patrón moteado, tal como fuese reportado por la bibliografía [280,279].

La progesterona es sintetizada por la enzima 3β -HSD, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro de rata [281]. Ha sido reportado que, en la médula espinal, la mayor actividad de 3β -HSD es seguida por una hiper producción de progesterona y se da en forma simultánea a la sobreexpresión de *3\beta-hsd* [282]. Por lo tanto, el aumento en la expresión de *3\beta-hsd* en VMN de animales alimentados con CAF en el largo plazo, podría conducir a grandes cantidades de progesterona que estimularían un incremento en la ingesta energética [113]. En línea con esto, se observó un incremento del receptor de esta hormona en ARC de hembras alimentadas con CAF a largo plazo, por lo que podríamos suponer que hay una comunicación parácrina que estaría mediando la acción orexígena de la progesterona. A su vez, a nivel proteico se observó una gran expresión de *Rp* en ARC. Por otro lado, ha sido reportado que la alopregnanolona, un metabolito de la progesterona sintetizado primero por la enzima 5α -R y posteriormente por 3α -HSD, promueve la ingesta de comida de alta palatabilidad [283]. Además, se ha demostrado que una menor expresión de ARNm de *5\alpha-r* conduce a una disminución en los niveles cerebrales de alopregnanolona [284]. Nuestros resultados muestran que las ratas alimentadas con CAF disminuyeron los niveles de ARNm de *5\alpha-r* en PVN tanto en el **mediano como largo plazo**, pero duplicaron la expresión de *3\alpha-hsd* en VMN en el largo plazo, sugiriendo que la dieta CAF podría modular de diferente manera la síntesis de alopregnanolona en núcleos hipotalámicos discretos. Además, ha sido reportado un efecto estimulante de alopregnanolona sobre la liberación de DA en NAc, mecanismo neurobiológico que podría mediar algunos de los efectos conductuales de los neuroesteroides particularmente sobre la motivación y la recompensa [285]. Además, la bibliografía indica que el aumento en la liberación de DA inducido por alopregnanolona *per se* es similar al inducido por los reforzadores naturales, tales como los alimentos de alta palatabilidad [286]. A su vez, han sido reportadas conexiones neuronales

recíprocas entre VMN y NAc [287]. De esta manera, pese a que no vimos cambios en los receptores de DA en NAc en el largo plazo, podría ser que, si existiese una mayor síntesis de este neuroesteroide en VMN, el mismo esté provocando una mayor liberación de DA en NAc y mediando el efecto placentero de la comida CAF. A nivel proteico, se observó que la 5α -R se expresó en escasa cantidad en células de la glía en PVN, VMN y ARC, tal como fuese reportado [288,289]. Aunque sería interesante relacionar los cambios que encontramos a nivel de ARNm con cambios en la expresión proteica, la cuantificación por *Western blot* o inmunohistoquímica resulta compleja debido a la baja expresión de estas enzimas en cerebro [290]. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la dieta CAF modifica la expresión de varias enzimas involucradas en la síntesis de neuroesteroides *de novo* en diferentes núcleos hipotalámicos, lo que podría tener un impacto significativo en el control de la ingesta de alimentos.

Con el fin de determinar si la metilación diferencial del ADN es un posible mecanismo molecular involucrado en los cambios de expresión génica encontrados, se analizó el patrón de metilación de los promotores de los genes 5α -*r*, 3α -*hsd* y *Aro* en los núcleos PVN y VMN de animales alimentados con dieta CAF en el corto, mediano y largo plazo. En PVN de ratas alimentadas con CAF en el **mediano plazo y largo plazo**, se observó un estado de hipermetilación del promotor de 5α -*r*, lo cual podría explicar la disminución de la expresión del ARNm de esta enzima observada. El promotor 5α -*r* se encontró metilado en dos sitios adyacentes a potenciales sitios de unión para los factores de transcripción Sp1 y GATA-1. En este sentido, ha sido reportado que la actividad del promotor 5α -*r* depende de la presencia del factor de transcripción Sp1 [291]. Además, algunos autores han demostrado que la hipermetilación corriente arriba de la secuencia de unión del factor Sp1 en 5α -*r* puede bloquear su actividad [292]. Estos resultados sugieren que la disminución en la expresión de 5α -*r* observada en PVN de animales alimentados con CAF en el mediano y largo plazo podría deberse a una metilación de los sitios estudiados, que interfieren con la unión del factor de transcripción Sp1. El estado de metilación del promotor de *Aro* se analizó en PVN y VMN de los animales. En PVN de ratas alimentadas con CAF se observó una reducción en el estado de metilación del sitio *Mae II* del promotor II de *Aro*. En este sitio, se describió una secuencia tipo elemento sensible al adenósín monofosfato cíclico (AMPc) llamada CLS [293]. Esta región es reconocida por la proteína de unión al elemento sensible al AMPc y la mutación de este elemento reduce en gran medida la inducción de la actividad promovida por el AMPc [294,295]. En este sentido, ha sido reportado que cuando los CLS críticos dentro del promotor II de *Aro* se encuentran hipermetilados en fibroblastos del tejido adiposo, los niveles de expresión de *Aro* se alteran, probablemente mediante la modulación de la unión del factor CREB al sitio CRE proximal [296]. Por lo tanto, el estado de hipometilación del sitio CLS podría estar participando en el incremento en la expresión del ARNm de *Aro* observada en PVN de animales CAF en el largo plazo. Curiosamente, nuestro grupo ha informado previamente cambios en el estado de metilación de estos mismos sitios del

promotor en el hipocampo [134,104], lo que sugiere que los sitios sensibles a la metilación estudiados podrían ser importantes sitios de regulación transcripcional en la expresión de las enzimas neurosteroidogénicas en diversas situaciones fisiopatológicas. Sin embargo, pese a que la expresión génica se vio modificada, no se encontraron cambios en el estado de metilación de *Aro* o *3 α -hsd* en VMN, en ninguno de los tiempos estudiados. Estos mismos resultados fueron obtenidos por otros autores sobre el estado de metilación del gen *3 α -hsd* en el hipocampo [104]. Sin embargo, debido a las limitaciones propias de la técnica utilizada algunos sitios CG potencialmente metilables no fueron incluidos en el análisis. Sumado a ello, es posible que la transcripción de dichos genes sea regulada por otros mecanismos no incluidos en este estudio. En este sentido, la modificación de las histonas ha sido asociada con la represión y activación transcripcional de los genes implicados en la biosíntesis y la acción de las hormonas esteroides [129]. Por otra parte, ha sido reportada la implicancia de ciertos factores de transcripción sobre la regulación de la expresión de *3 α -hsd*. A modo de ejemplo, las regiones flanqueantes en 5' de los genes de *3 α -hsd* tanto de rata como de humano contienen secuencias de consenso para AP-1, Oct-1 y elementos de respuesta a hormonas esteroides, que podrían estar involucrados en el control de la expresión génica de esta enzima [297]. Por lo tanto, representa un desafío estudiar otras posibles modificaciones o alteraciones epigenéticas en la acción de los factores de transcripción que están asociados con la regulación de la expresión del ARNm del gen *3 α -hsd*.

- ***Efecto de la duración de la intervención dietaria sobre la expresión de enzimas neurosteroidogénicas y receptores hormonales esteroides.***

La expresión hipotalámica de la mayoría los genes que codifican para las enzimas neurosteroidogénicas fue afectada por la duración de la intervención dietaria, pero de manera diferencial en los distintos núcleos estudiados. Se encontró una disminución de los niveles de ARNm de *3 β -hsd* en ARC y PVN, *5 α -r* en PVN y *3 α -hsd* y *Aro* en VMN con el tiempo tanto en hembras alimentadas con dieta C como CAF. En este sentido, fue reportado por nuestro grupo que, en hipocampo de hembras, se presenta una disminución de estas enzimas con la edad [104]. Los cambios en la expresión de las enzimas neurosteroidogénicas detectados con la edad podrían afectar los niveles de neuroesteroides en los animales adultos mayores. Así, algunos autores correlacionaron una disminución en los niveles de proteína y de ARNm de la enzima *5 α -r* con una reducción de aproximadamente el 50% de los niveles de alopregnanolona en la corteza frontal de ratones [284]. Además, se encontró una disminución de *Re α* con la duración de la intervención dietaria en ARC, PVN y VMN y de *R ρ* en PVN y VMN. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha reportado una disminución de la expresión de *Re α* en el hipocampo de roedores adultos, sugiriendo que el tiempo no sólo estaría afectando la síntesis de los neuroesteroides, sino también las vías de acción de los mismos [298].

- ***Efecto de la dieta materna CAF sobre la progenie.***
- ***La dieta materna CAF disminuyó significativamente el peso corporal de la progenie desde el nacimiento hasta el DPN10.***

En la actualidad se sabe que la obesidad materna durante el embarazo aumenta el riesgo de obesidad en la descendencia, al menos en parte, a través de los efectos que produce en el desarrollo del cerebro durante los estadios peri- y post-natales tempranos [299]. No se registraron diferencias de peso corporal entre la progenie E21 de hembras alimentadas con dieta C o CAF. Sin embargo, esta diferencia podría existir y no ser observada dada la limitada sensibilidad de la balanza utilizada frente al bajo peso de las crías. La dieta materna CAF redujo significativamente el peso corporal de las crías desde el nacimiento (17%) hasta el DPN10 (30%). En este sentido, han sido reportados resultados similares en la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF en DPN1 y DPN21 [10] como así también en DPN3 [8]. Por el contrario, las crías provenientes de madres alimentadas con una dieta rica en grasas no presentaron diferencias de peso corporal al nacer, mientras que en DPN16 y DPN19 el peso corporal de la descendencia fue un 30% mayor en comparación con las crías de hembras alimentadas con alimento balanceado [300,18]. Estos resultados nos sugieren que los efectos de una dieta materna CAF sobre el peso corporal de la descendencia son opuestos a los observados en la descendencia de las madres alimentadas con otras dietas obesógenas como la dieta rica en grasas. La disminución en el peso corporal de las crías provenientes de madres alimentadas con dieta CAF podría deberse al excesivo peso corporal materno, que se propone actuaría como un agente de programación *per se*, o a otros aspectos de la dieta CAF, tales como su alto contenido de grasa o su bajo contenido de proteínas [9]. En este sentido, al aumento en la ingesta energética de las madres alimentadas con CAF se suma el hecho de que las mismas consumieron una proporción de energía en forma de grasas muy alta y una mucho menor en forma de proteínas, respecto a las madres C (datos no mostrados), tal como fuese reportado por otros grupos [10,190,9,301,195]. La ingesta reducida de proteínas durante la gestación y la lactancia sería un factor clave para explicar la reducción del peso observada al nacer y al destete en las crías provenientes de madres CAF y que la ingesta de proteínas materna, en lugar de la ingesta total de energía, desempeñaría un papel fundamental en la regulación de la masa corporal de la descendencia [10]. Es importante destacar que el efecto observado en el peso corporal de las crías CAF-DPN10 es similar al reportado para la descendencia de madres alimentadas con un modelo de dieta baja en proteínas [302,303]. Por otro lado, la ingesta limitada de proteínas de la dieta CAF podría afectar también la producción y composición de la leche materna. Aunque este factor no fue analizado en la presente Tesis, ha sido reportado que la leche proveniente de ratas alimentadas con dieta CAF contiene más energía, primando el contenido de grasa y de ácidos grasos de cadena larga, pero menos proteína y ácidos grasos de cadena media que la proveniente de madres alimentadas con alimento balanceado [304]. Por el contrario, otros autores informaron que no se encontraron diferencias en el contenido de proteínas de la leche

provenientes de madres CAF o C, a pesar de la menor ingesta de proteínas de las madres durante el embarazo y la lactancia [305-307]. Es importante destacar que no se encontraron diferencias en la eficiencia reproductiva entre las madres C y CAF, tal como fuese sugerido por Akyol y col. [9]. Por último, investigaciones previas han demostrado que el consumo materno de alimentos de alta palatabilidad puede, además de aumentar el apetito en general, predisponer a la preferencia hacia alimentos ricos en grasas y/o azúcares, incrementando la probabilidad de la F1 a presentar obesidad [299,8,10].

- ***La dieta materna CAF afecta los mecanismos homeostáticos de control de la ingesta en la progenie.***

El desarrollo de la red hipotalámica de regulación del apetito en roedores ocurre predominantemente después del nacimiento. Si bien los neuropéptidos se expresan desde los 14.5 días de gestación, las proyecciones entre los distintos núcleos no se completan hasta aproximadamente los 10 a 11 días después del nacimiento [16]. Está bien establecido que el fenotipo de un individuo puede ser impulsado tanto por el ambiente *in utero* como post-natal temprano, entre ellos el estado nutricional de la madre [308]. Esto ha dado lugar a la noción de "programación del desarrollo" que propone que las condiciones presentadas durante una ventana crítica del desarrollo pueden conducir a alteraciones programadas permanentes en los sistemas fisiológicos en el largo plazo [308]. Ha sido reportado que el consumo materno de una dieta rica en grasa reprograma permanentemente el sistema homeostático de control de la ingesta, favoreciendo las vías orexígenas en la descendencia [201]. En este sentido, encontramos que la progenie de las madres alimentadas con dieta CAF presentaron disminuciones en la expresión de *Pomc* en el APV del hipotálamo, tanto en un estadio embrionario (E21) como en uno post-natal temprano (DPN10), desregulación que podría predisponer a un estado orexígeno del hipotálamo. Ha sido reportado que crías provenientes de hembras alimentadas con una dieta rica en grasa presentaron menores niveles de expresión de *Pomc* en el hipotálamo [309]. Además, la alimentación exclusiva con leche materna proveniente de hembras diabéticas disminuyó la expresión proteica tanto de *Pomc* como de *α -msh* en la progenie [310]. Estos cambios podrían deberse a alteraciones en la producción de leptina e insulina. En este sentido, en roedores se produce un pico de producción y liberación de leptina entre DPN7 y 10, sugiriendo que esta hormona juega un papel importante en el desarrollo de los sistemas neuronales en el embrión, principalmente en aquellos que responden a la misma [311]. De esta manera, las concentraciones inadecuadas o un cambio en los niveles de estas hormonas durante una ventana crítica del desarrollo neuronal y de las conexiones hipotalámicas pueden tener consecuencias estructurales permanentes [312]. Ha sido reportado que la administración de dieta CAF durante el embarazo y la lactancia genera un aumento de los niveles de leptina e insulina circulantes en la progenie debido a su transferencia a través de la placenta o la leche [15], lo que podría alterar el desarrollo normal de las vías de control de ingesta hipotalámicas en la F1. A su vez, se ha descrito que crías

de hembras alimentadas con dieta CAF presentaron concentraciones mayores de leptina en periodos perinatales, los cuales disminuyen con la edad pero que están relacionados con una mayor ingesta de alimentos palatables en la adultez [15,8]. Además de presentar las vías anorexígenas disminuidas, la reducción de la expresión de *Obrb* en E21 sugeriría que la progenie de madres con sobrepeso estaría presentando una resistencia central a la leptina temprana, pero que no persiste en el tiempo, dado que sus valores se normalizan en DPN10 [309]. Además, pese a que no se estudió en la progenie, la bibliografía indica que las crías de las madres alimentadas con dieta CAF presentan un exceso de adiposidad, lo que podría estar llevando a mayores niveles de leptina circulantes y generando resistencia central a esta hormona [10,313].

- ***La dieta materna CAF altera el sistema de recompensa cerebral de la progenie.***

La ontogenia del sistema de DA en roedores ha sido estudiada por varios autores [15,299,314,315]. Algunos han reportado que el desarrollo del sistema dopaminérgico en la rata comienza durante la vida embrionaria y continúa hasta la tercera semana post-natal [316]. Las primeras neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica pueden identificarse en el cerebro de rata en E12, aunque las inervaciones de los axones dopaminérgicos no se completan hasta la tercera semana de vida postnatal [15]. El ARNm de *Th* ha sido encontrado en cerebro en estadíos embrionarios tempranos (E10-E12) y su actividad específica aumentó desde la gestación hasta la edad adulta [317-319]. Además, los receptores *Drd1* y *Drd2* se detectaron en tejidos neurales en E14 y en E18 su localización fue similar a la observada en el cerebro adulto. La expresión de ARNm para ambos subtipos de receptores de DA en el sistema mesolímbico en ratas al nacer se aproxima a la observada en ratas adultas [320,321]. Por otro lado, el ARNm de *Dat* se detectó por primera vez en E14. En E18, las neuronas que lo expresan en ATV presentaron un patrón similar al encontrado en el cerebro adulto [322,323]. En línea con todo lo expuesto, detectamos la presencia de ARNm de *Th*, *Drd1*, *Drd2* y *Dat* en ATV y NAc en E21.

Las crías en DPN10 de madres alimentadas con dieta CAF presentaron una disminución en la expresión del ARNm de *Th*, *Drd2* y *Dat* en ATV y una reducción en los niveles de transcripto de *Drd1* y *Drd2* en NAc, sugiriendo que podría existir una reducción de la señalización de DA en el sistema de recompensa mesolímbico de estos animales. A su vez se encontró una menor expresión de *Drd2* en CeA. Algunos autores han reportado los efectos de la alimentación materna sobre la descendencia en la adultez encontrando una reducción de la señalización en las vías dopaminérgicas y una preferencia por la comida alta en grasa [8,132,324]. Por otro lado, la menor expresión de *Th* en ATV observada se ha relacionado previamente con una producción reducida de DA [324]. Además, se ha informado que la ghrelina impacta en ATV e induce la liberación de DA [55], proponiendo que la coexistencia de GhSR-TH coordina la regulación de los niveles de DA. En este sentido, también encontramos menores niveles de *Ghsr* en ATV en crías en DPN10 provenientes de hembras CAF. Se ha reportado que la ghrelina

incentiva la ingesta de alimentos aumentando los niveles de DA en NAc, y las proyecciones dopaminérgicas del ATV al NAc, junto con la activación de DRD1 y DRD2 en NAc [325]. Aunque estos estudios se han realizado en ratas adultas, algunos trabajos sugieren que la ghrelina y su receptor tienen un papel fundamental en el crecimiento lineal y desarrollo en la vida temprana [326,327]. Es importante resaltar que, al momento de presentación de este trabajo de Tesis, no hay estudios previos sobre el efecto de la dieta materna CAF en la expresión de los genes de la vía dopaminérgica en estadios perinatales de la progenie. Una menor expresión de *Dat* en NAc de crías en DPN42 provenientes de madres alimentadas con dieta CAF ha sido reportada [8]. Otros autores demostraron que las crías de madres alimentadas con una dieta rica en grasa redujeron la señalización de DA mediante la disminución de la expresión de los receptores *Drd1* y *Drd2* y el aumento de la expresión de *Dat* en la adultez [252]. En conjunto, pese a que los modelos dietarios y las edades de los animales en estudio difieren, podría sugerirse que una dieta materna con alto contenido graso, como es la dieta CAF, podría establecer alteraciones permanentes en la función de la vía dopaminérgica de la progenie, pudiendo tener un efecto duradero más adelante en la vida y en la edad adulta, alterándola de manera irreversible. Además, la disminución de *Drd2* en NAc y ATV en DPN10, podría ser un marcador temprano de una condición de obesidad en la edad adulta. En este sentido, existe evidencia de que el DRD2 de las neuronas dopaminérgicas del ATV actúa como receptor pre-sináptico, auto-inhibiendo la acción de estas neuronas, y que una disminución de *Drd2* en este núcleo promueve una conducta de adicción hacia la comida de alta palatabilidad en humanos [328]. Por último, observamos que los niveles de transcripción de los genes de la vía dopaminérgica aumentaron de E21 a PND10, sugiriendo que el desarrollo del sistema dopaminérgico en la rata continúa desde la etapa embrionaria hasta las primeras semanas de vida.

Encontramos que los cambios tempranos en la expresión génica de *Th*, *Drd2* y *Dat* en ATV y de *Drd1* y *Dat* en NAc en ratas hembras están acompañados por alteraciones en la metilación del ADN del promotor. Particularmente, la menor expresión de *Drd2* en ATV fue asociada a mayores niveles de metilación en un sitio *BstUI* del promotor, que coincide con un sitio putativo de unión al factor de transcripción proteína activadora 2 (AP-2). Esto es muy interesante ya que ha sido reportado que este factor de transcripción juega un papel importante en el desarrollo embrionario del mesencéfalo [329]. Además, en el cerebro de rata se han reportado cambios en los niveles de metilación y la actividad de unión al ADN en sitios de unión a AP-2 en algunos trastornos dietarios, como el atracón [329]. Por otro lado, el promotor de *Dat* se encontró hipermetilado, tanto en ATV como en NAc, en un sitio putativo de unión para el factor de transcripción Elk-1. En este sentido, ha sido reportado que este factor es tejido específico y se ha propuesto que tiene un rol regulatorio fundamental durante el desarrollo y la diferenciación [330]. Es importante aclarar que, debido a las limitaciones de la técnica, algunos sitios de CG dirigidos a la metilación no se incluyeron en el análisis; sin embargo, también es posible que la transcripción

de estos genes esté regulada por otros mecanismos epigenéticos que no se incluyeron en este estudio, como las modificaciones de histonas o por ciertos factores de transcripción [331,332].

A diferencia de la información existente sobre la ontogenia de las vías dopaminérgicas, la expresión de los genes relacionados con la vía GABAérgicas, no han sido reportados en las regiones y los estadios aquí presentados, siendo este trabajo de Tesis el primero en detectar e informar la presencia de ARNm de las isoformas *Gad1* y *Gad2* en ATV y AHL en E21 de rata. Por otro lado, se encontró una disminución en la expresión de *Gad1* en crías en DPN10 de madres alimentadas con dieta CAF. Se ha propuesto que el nivel de ARNm de *Gad* podría ser un representante fiable de la liberación de GABA [333] y que las interneuronas GABAérgicas del ATV inhiben a las neuronas dopaminérgicas, no sólo localmente sino también en la regiones hacia las cuales se proyectan, entre las que se incluye el NAc [334]. En este sentido, la menor expresión de *Gad1* en ATV podría llevar a una menor liberación de GABA, probablemente en un intento por desinhibir las neuronas dopaminérgicas de ATV y NAc, de modo de restaurar la señalización disminuida de DA que presentan las crías en DPN21 provenientes de hembras CAF.

Por otro lado, se evidenció que una dieta materna CAF incrementó los niveles de expresión de *Mor*, el principal receptor de opioides involucrado en la repuesta hacia alimentos de alta palatabilidad, sólo en BLA de crías en DPN10. Es importante mencionar que no se han reportado estudios sobre la expresión de *Mor* en la progenie de madres CAF en los periodos embrionarios en regiones como AHL, BLA y CeA. Nuestros resultados se corresponden con lo reportado por Gugusheff y col. [299] quienes observaron una expresión normal de *Mor* en ATV y NAc de crías de madres alimentadas con dieta CAF en periodo de lactancia (DPN1 y 7). Estos resultados, junto con los obtenidos en este trabajo de Tesis proporcionarían evidencia de que la dieta materna puede influir sobre la vía de los opioides según la edad de la progenie. Por otra parte, la bibliografía sugiere que un aumento en la señalización opioide por medio de *Mor* puede promover la obesidad [70]. En BLA, la señalización de opioides está vinculada a las propiedades de los alimentos, que modulan el valor de incentivo de la comida y el comportamiento de búsqueda de recompensa, contribuyendo así al deseo de los alimentos de alta palatabilidad [335]. En este sentido, el incremento de *Mor* en BLA de crías en DPN10 provenientes de madres CAF podría relacionarse entonces con un deseo mayor de consumir alimentos de alta palatabilidad en exceso y posiblemente desarrollar obesidad durante su vida adulta.

La progenie en DPN10 proveniente de madres alimentadas con dieta CAF presentó una disminución en la expresión del receptor *Hcrtr2* de OX tanto en ATV como en NAc. Al momento, no hay reportes sobre el efecto de la dieta materna CAF sobre la expresión de dichos genes en la progenie en estadios perinatales. De acuerdo con los resultados obtenidos, dado que no se han encontrado cambios en la expresión de *Ox* en AHL, inferimos que la vía orexinérgica no estarían interviniendo en la regulación de la ingesta en los periodos tempranos de vida, y que el efecto generado por la dieta materna CAF no tendría un impacto trascendente sobre esta vía.

- ***La dieta materna CAF altera la expresión de enzimas neuroesteroideogénicas en hipotálamo de la progenie en DPN10.***

Ha sido demostrado que la síntesis *de novo* de esteroides se produce en el cerebro en desarrollo de roedores [103], indicando que la proteína StAR ya es funcional durante el período postnatal temprano. En este sentido estudios inmunohistoquímicos revelan que la proteína es detectada por primera vez en DPN1 en ratón y en DPN10 en rata, sin embargo no se han reportado estudios de la expresión de StAR en cerebro en el estadio embrionario [103]. Por otro lado, se ha reportado que el ARNm de 5α -R se expresa en las zonas germinales y ventriculares del cerebro de rata desde el día E12. La expresión transitoria del gen 5α -R en las zonas germinales y las áreas diferenciadas del cerebro en desarrollo de los roedores sugiere que los esteroides 5α -reducidos pueden ejercer funciones importantes en la proliferación y diferenciación neuronal durante la ontogénesis [103]. Además, una actividad enzimática alta de 5α -R se observa en el cerebro de roedores durante las dos primeras semanas postnatales, un período de intensa mielinogénesis, sugiriendo que los esteroides 5α -reducidos podrían participar en el control de la formación de la mielina [103]. A su vez, se ha reportado actividad de 3α -HSD durante las primeras semanas postnatales (antes de la pubertad) de roedores [336]. Por último, durante la ontogénesis del cerebro de rata, el gen ARO se expresa primero en las áreas preóptica e hipotalámica a partir del día E16 [337]. De esta manera, el presente trabajo demuestra que hay expresión de las proteínas y enzimas neuroesteroideogénicas, StAR, 3β -HSD, 5α -R, 3α -HSD y ARO en estadios embrionarios, representando un hallazgo puesto que la expresión de las mismas en hipotálamo no ha sido reportada al momento. El incremento en la expresión de 3α -HSD observado en AHP de crías en DPN10 provenientes de madres alimentadas con dieta CAF podría conllevar a una mayor producción de alopregnanolona, lo que podría estar relacionado a una respuesta orexígena, que, de mantenerse en el tiempo, podría llevar a un estado de obesidad.

- ***Efecto de la edad sobre la expresión de genes en la progenie***

A modo general, nuestros resultados demuestran que los niveles de transcripto de los genes estudiados son mayores en la progenie en DPN10 con respecto a los observados en E21. Específicamente, este perfil de expresión se observa en la mayoría de los genes implicados en las vías homeostática (excepto POMC), dopaminérgica, GABAérgica, orexinérgica, neuroesteroideogénica y en la expresión de receptores hormonales, en la mayor parte de las regiones cerebrales analizadas. Se podría inferir que, en general, los niveles de transcriptos aumentan con la edad durante los estadios perinatales, a pesar de que algunos genes presenten un perfil de expresión particular. En base a lo expuesto, proponemos que los niveles de transcriptos estarían ligados al estadio de desarrollo en el cual se encuentra el animal. En este sentido, en E21 los sistemas homeostático, hedónico y neuroesteroideogénico estudiados se encontrarían en una etapa temprana del desarrollo y, pese a que sus componentes ya son detectables, estos sistemas podrían no encontrarse totalmente activos. Por otro lado, en DPN10 los mayores niveles de

transcripto podrían indicar que estos sistemas estarían más desarrollados. Todo lo expuesto demuestra que la última semana de vida embrionaria y las primeras semanas postnatales son períodos críticos en el desarrollo de los sistemas de control de ingesta, los cuales son particularmente vulnerable a las influencias del entorno, resultando cruciales para determinar el desarrollo de la vida posterior.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis nos permiten concluir que el consumo de alimentos de alta palatabilidad de manera prolongada desde etapas tempranas de la vida altera de forma diferencial y progresiva los sistemas cerebrales involucrados en el control de la ingesta, conduciendo a un estado de obesidad a largo plazo.

- En todos los tiempos estudiados, la dieta CAF promovió una mayor **ingesta** energética, sin hiperfagia. Pese a la gran variabilidad de alimentos ofrecidos, la ingesta de macronutrientes se mantuvo constante en el tiempo, destacándose el elevado consumo de grasas y la baja proporción de proteínas. Las hembras CAF consumieron los diferentes alimentos de alta palatabilidad por sobre el alimento balanceado, primando la ingesta de alimentos salados en relación a los dulces a corto plazo, elección que se modifica en el mediano y largo plazo, al incrementarse la ingesta de alimentos dulces en proporción a los salados.

- La elevada ingesta energética a **corto plazo** se vio reflejada en un incremento de la adiposidad, sin afectar el peso corporal o los parámetros séricos. A **mediano plazo**, la acrecentada ingesta energética trajo aparejada un mayor incremento en los tejidos adiposos, conllevando a un aumento tanto en el peso corporal – que derivó en sobrepeso - como en los niveles de leptina circulantes. Esto se exacerbó en el **largo plazo**, momento en el cual se manifestó un cuadro de obesidad.

- La desregulación de la vía homeostática de control de la ingesta desempeñó un papel importante en el **mediano y largo plazo** de la intervención dietaria con CAF. En este sentido, la señal orexígena proveniente del HL, PVN y VMN, mediante el incremento de la expresión de *Ox*, *Npy* y *Agrp*, impulsaría el gran aumento en la ingesta energética, superando la acción anorexígena del ARC, Esta señal anorexígena estaría respondiendo a la acción de la leptina, dado que sensibilidad a esta hormona no estaría afectada en el ARC.

- A **corto plazo**, el incremento en la ingesta energética respondería a alteraciones en los mecanismos hedónicos. En este sentido, desregulaciones a nivel molecular en las vías dopaminérgica, GABAérgica y opioide podrían afectar la motivación por la comida palatable. Particularmente, se observó una disminución de las vías que involucran tanto a la dopamina como al GABA y a los opioides. Estos cambios trajeron aparejados alteraciones en la saciedad sensorial específica, el juego social, el comportamiento exploratorio y los niveles de ansiedad y estarían vinculados con un mayor consumo de comida palatable como un modo de compensar el incremento en los umbrales de recompensa. En su mayoría, estos mecanismos se reestablecen en el mediano y largo plazo.

- La dieta CAF afectó la expresión de enzimas neuroesteroideogénicas en el **mediano y largo plazo** principalmente en el PVN y VMN, hecho que podría afectar la síntesis de E₂, progesterona y alopregnanolona. Los cambios observados podrían desempeñar un papel

importante en la regulación del balance energético, dada la influencia de los neuroesteroides en el control de la ingesta de alimentos.

- En los animales alimentados con CAF, los cambios en los niveles de expresión encontrados en algunos de los genes de las vías homeostática, hedónica y neuroesteroidogénica estarían asociados a modificaciones en el patrón de metilación del ADN en las regiones promotoras de los mismos, indicando que mecanismos epigenéticos podrían estar involucrados en su control.

- El estudio de la progenie demostró que la dieta materna CAF disminuyó significativamente el peso corporal de las crías, afectando los sistemas tanto homeostático como hedónico de control de ingesta. Muchos de estos cambios se relacionaron con el estado de metilación de regiones promotoras, indicando que la dieta materna CAF podría alterar la regulación transcripcional de los genes de la vía dopaminérgica, los cuales estarían regulados por mecanismos epigenéticos.

Finalmente, entender los procesos fisiológicos y moleculares que controlan la ingesta al comienzo del desarrollo de la obesidad - principalmente de alimentos de alta palatabilidad y densidad energética prevalentes en la sociedad occidental - resulta esencial en el desarrollo de terapias tanto para el tratamiento como para la prevención de esta patología y sus trastornos asociados.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] WH Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894:i-xii, 1-253.
- [2] J Brug (2007) The European charter for counteracting obesity: a late but important step towards action. Observations on the WHO-Europe ministerial conference, Istanbul, November 15-17, 2006. *Int J Behav Nutr Phys Act* 4:11.
- [3] J Salas-Salvado, MA Rubio, M Barbany, B Moreno (2007) Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria. *Med Clin (Barc)* 128 (5):184-196.
- [4] S Mendis, S Davis, B Norrving (2015) Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke* 46 (5):e121-122.
- [5] BH Breier, MH Vickers, BA Ikenasio, KY Chan, WP Wong (2001) Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 185 (1-2):73-79.
- [6] MdSdlN Argentina (2016) Obesidad: Determinantes, epidemiología y su abordaje desde la salud pública. *Boletín de Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles y Factores de Riesgo* nro 8.
- [7] MdSdlN Argentina (2013) *Tercera encuesta nacional de factores de riesgo para enfermedades no transmisibles*, Argentina.
- [8] ZY Ong, BS Muhlhausler (2011) Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 25 (7):2167-2179.
- [9] A Akyol, SC Langley-Evans, S McMullen (2009) Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. *Br J Nutr* 102 (11):1601-1610.
- [10] SA Bayol, SJ Farrington, NC Stickland (2007) A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr* 98 (4):843-851.
- [11] JL Weiss, FD Malone, D Emig, RH Ball, DA Nyberg, CH Comstock, G Saade, K Eddleman, SM Carter, SD Craigo, SR Carr, ME D'Alton (2004) Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate: a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol* 190 (4):1091-1097.
- [12] IC McMillen, JS Robinson (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85 (2):571-633.
- [13] PM Catalano (2007) Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 109 (2 Pt 1):419-433.
- [14] A Jahan-Mihan, J Rodriguez, C Christie, M Sadeghi, T Zerbe (2015) The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. *Nutrients* 7 (11):9185-9217.
- [15] ZY Ong, JR Gugusheff, BS Muhlhausler (2012) Perinatal overnutrition and the programming of food preferences: pathways and mechanisms. *J Dev Orig Health Dis* 3 (5):299-308.
- [16] IC McMillen, CL Adam, BS Muhlhausler (2005) Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol* 565 (Pt 1):9-17.
- [17] AM Samuelsson, PA Matthews, M Argenton, MR Christie, JM McConnell, EH Jansen, AH Piersma, SE Ozanne, DF Twinn, C Remacle, A Rowleson, L Poston, PD Taylor (2008) Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51 (2):383-392.
- [18] H Chen, D Simar, K Lambert, J Mercier, MJ Morris (2008) Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology* 149 (11):5348-5356.
- [19] OG Edholm (1977) Energy balance in man studies carried out by the Division of Human Physiology, National Institute for Medical Research. *J Hum Nutr* 31 (6):413-431.
- [20] C Broberger (2005) Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* 258 (4):301-327.
- [21] FJ Meye, RA Adan (2014) Feelings about food: the ventral tegmental area in food reward and emotional eating. *Trends Pharmacol Sci* 35 (1):31-40.

- [22] C Erlanson-Albertsson (2005) How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (2):61-73.
- [23] SC Woods, SC Benoit, DJ Clegg, RJ Seeley (2004) Clinical endocrinology and metabolism. Regulation of energy homeostasis by peripheral signals. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18 (4):497-515.
- [24] G Williams, JA Harrold, DJ Cutler (2000) The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 59 (3):385-396.
- [25] C Bjorbaek, BB Kahn (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305-331.
- [26] K Wynne, S Stanley, B McGowan, S Bloom (2005) Appetite control. *J Endocrinol* 184 (2):291-318.
- [27] JJ Hillebrand, D de Wied, RA Adan (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23 (12):2283-2306.
- [28] L Plum, M Schubert, JC Bruning (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16 (2):59-65.
- [29] J Seufert (2004) Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 53 Suppl 1:S152-158.
- [30] AK Portella, PP Silveira, DP Laureano, S Cardoso, V Bittencourt, C Noschang, I Werlang, FU Fontella, C Dalmaz, MZ Goldani (2015) Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. *Behav Brain Res* 278:66-73.
- [31] TM Hsu, AN Suarez, SE Kanoski (2016) Ghrelin: A link between memory and ingestive behavior. *Physiol Behav* 162:10-17.
- [32] WN Cong, E Golden, N Pantaleo, CM White, S Maudsley, B Martin (2010) Ghrelin receptor signaling: a promising therapeutic target for metabolic syndrome and cognitive dysfunction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9 (5):557-563.
- [33] J Wang, JT Alexander, P Zheng, HJ Yu, J Dourmashkin, SF Leibowitz (1998) Behavioral and endocrine traits of obesity-prone and obesity-resistant rats on macronutrient diets. *Am J Physiol* 274 (6):E1057-1066.
- [34] SF Leibowitz, KE Wortley (2004) Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25 (3):473-504.
- [35] E Roh, DK Song, MS Kim (2016) Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med* 48:e216.
- [36] M Palkovits (2003) Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyogy Sz* 56 (9-10):288-302.
- [37] MW Schwartz, SC Woods, D Porte, Jr., RJ Seeley, DG Baskin (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404 (6778):661-671.
- [38] E Valassi, M Scacchi, F Cavagnini (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18 (2):158-168.
- [39] B Coupe, V Amarger, I Grit, A Benani, P Parnet (2010) Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151 (2):702-713.
- [40] MO Dietrich, TL Horvath (2013) Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 36 (2):65-73.
- [41] S Arora, Anubhuti (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides* 40 (6):375-401.
- [42] T Kishi, CJ Aschkenasi, BJ Choi, ME Lopez, CE Lee, H Liu, AN Hollenberg, JM Friedman, JK Elmquist (2005) Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor. *J Comp Neurol* 482 (3):217-243.
- [43] MA Lazarczyk, M Lazarczyk, T Grzela (2003) Ghrelin: a recently discovered gut-brain peptide (review). *Int J Mol Med* 12 (3):279-287.
- [44] BM King (2006) The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 87 (2):221-244.
- [45] C Peyron, DK Tighe, AN van den Pol, L de Lecea, HC Heller, JG Sutcliffe, TS Kilduff (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18 (23):9996-10015.

- [46] C Kotz, J Nixon, T Butterick, C Perez-Leighton, J Teske, C Billington (2012) Brain orexin promotes obesity resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1264:72-86.
- [47] C Broberger, L De Lecea, JG Sutcliffe, T Hokfelt (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402 (4):460-474.
- [48] DL Choi, JF Davis, ME Fitzgerald, SC Benoit (2010) The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* 167 (1):11-20.
- [49] D Bagnol, XY Lu, CB Kaelin, HE Day, M Ollmann, I Gantz, H Akil, GS Barsh, SJ Watson (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19 (18):RC26.
- [50] E Holmberg (2015) Allopregnanolone effects on food intake and weight gain. *Umeå University Medical Dissertations* 1711.
- [51] D Atasoy, JN Betley, HH Su, SM Sternson (2012) Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488 (7410):172-177.
- [52] M Prior, E Bavin, E Cini, P Eadie, S Reilly (2011) Relationships between language impairment, temperament, behavioural adjustment and maternal factors in a community sample of preschool children. *Int J Lang Commun Disord* 46 (4):489-494.
- [53] M Watabe-Uchida, L Zhu, SK Ogawa, A Vamanrao, N Uchida (2012) Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74 (5):858-873.
- [54] EJ Nestler (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8 (11):1445-1449.
- [55] S Fulton (2010) Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol* 31 (1):85-103.
- [56] V Bassareo, MA De Luca, G Di Chiara (2002) Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 22 (11):4709-4719.
- [57] V Bassareo, G Di Chiara (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience* 89 (3):637-641.
- [58] S Rahman, WJ McBride (2002) Involvement of GABA and cholinergic receptors in the nucleus accumbens on feedback control of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area. *J Neurochem* 80 (4):646-654.
- [59] H Castro, CA Pomar, C Pico, J Sanchez, A Palou (2015) Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int J Obes (Lond)* 39 (3):430-437.
- [60] YM Kupchik, RM Brown, JA Heinsbroek, MK Lobo, DJ Schwartz, PW Kalivas (2015) Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nat Neurosci* 18 (9):1230-1232.
- [61] C Bocklisch, V Pascoli, JC Wong, DR House, C Yvon, M de Roo, KR Tan, C Luscher (2013) Cocaine disinhibits dopamine neurons by potentiation of GABA transmission in the ventral tegmental area. *Science* 341 (6153):1521-1525.
- [62] JD Salamone, M Correa (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* 76 (3):470-485.
- [63] M Alonso-Alonso, SC Woods, M Pelchat, PS Grigson, E Stice, S Farooqi, CS Khoo, RD Mattes, GK Beauchamp (2015) Food reward system: current perspectives and future research needs. *Nutr Rev* 73 (5):296-307.
- [64] MP Saddoris, F Cacciapaglia, RM Wightman, RM Carelli (2015) Differential Dopamine Release Dynamics in the Nucleus Accumbens Core and Shell Reveal Complementary Signals for Error Prediction and Incentive Motivation. *J Neurosci* 35 (33):11572-11582.
- [65] JH Baik (2013) Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* 7:152.
- [66] GJ Wang, ND Volkow, JS Fowler (2002) The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity. *Expert Opin Ther Targets* 6 (5):601-609.
- [67] RR Gainetdinov, SR Jones, F Fumagalli, RM Wightman, MG Caron (1998) Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. *Brain Res Brain Res Rev* 26 (2-3):148-153.

- [68] CS Pinal, AJ Tobin (1998) Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol* 5 (2-3):109-118.
- [69] JY Cohen, S Haesler, L Vong, BB Lowell, N Uchida (2012) Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* 482 (7383):85-88.
- [70] BA Gosnell, AS Levine (2009) Reward systems and food intake: role of opioids. *Int J Obes (Lond)* 33 Suppl 2:S54-58.
- [71] SJ Russo, EJ Nestler (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 14 (9):609-625.
- [72] PH Janak, KM Tye (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517 (7534):284-292.
- [73] S Ahn, AG Phillips (2003) Independent modulation of basal and feeding-evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex by the central and basolateral amygdalar nuclei in the rat. *Neuroscience* 116 (1):295-305.
- [74] AG Phillips, S Ahn, JG Howland (2003) Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 27 (6):543-554.
- [75] AE Kelley (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev* 27 (8):765-776.
- [76] SV Mahler, KC Berridge (2009) Which cue to "want?" Central amygdala opioid activation enhances and focuses incentive salience on a prepotent reward cue. *J Neurosci* 29 (20):6500-6513.
- [77] SV Mahler, RJ Smith, DE Moorman, GC Sartor, G Aston-Jones (2012) Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Prog Brain Res* 198:79-121.
- [78] KR Urstadt, BG Stanley (2015) Direct hypothalamic and indirect trans-pallidal, trans-thalamic, or trans-septal control of accumbens signaling and their roles in food intake. *Front Syst Neurosci* 9:8.
- [79] EC O'Connor, Y Kremer, S Lefort, M Harada, V Pascoli, C Rohner, C Luscher (2015) Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron* 88 (3):553-564.
- [80] TR Stratford, D Wirtshafter (2012) Evidence that the nucleus accumbens shell, ventral pallidum, and lateral hypothalamus are components of a lateralized feeding circuit. *Behav Brain Res* 226 (2):548-554.
- [81] JD Hommel, R Trinko, RM Sears, D Georgescu, ZW Liu, XB Gao, JJ Thurmon, M Marinelli, RJ DiLeone (2006) Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51 (6):801-810.
- [82] M Matheny, A Shapiro, N Tumer, PJ Scarpace (2011) Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. *Neuropharmacology* 60 (2-3):480-487.
- [83] AI Domingos, J Vaynshteyn, HU Voss, X Ren, V Gradinaru, F Zang, K Deisseroth, IE de Araujo, J Friedman (2011) Leptin regulates the reward value of nutrient. *Nat Neurosci* 14 (12):1562-1568.
- [84] AW Bruijnzeel, LW Corrie, JA Rogers, H Yamada (2011) Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats. *Behav Brain Res* 219 (2):254-264.
- [85] S Liu, SL Borgland (2015) Regulation of the mesolimbic dopamine circuit by feeding peptides. *Neuroscience* 289:19-42.
- [86] JJ Cone, JE McCutcheon, MF Roitman (2014) Ghrelin acts as an interface between physiological state and phasic dopamine signaling. *J Neurosci* 34 (14):4905-4913.
- [87] XZ Khawaja, CJ Bailey, IC Green (1989) Central mu, delta, and kappa opioid binding sites, and brain and pituitary beta-endorphin and met-enkephalin in genetically obese (ob/ob) and lean mice. *Life Sci* 44 (16):1097-1105.
- [88] JM Zigman, SG Bouret, ZB Andrews (2016) Correction to 'Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System': [Trends in Endocrinology and Metabolism, 27 (2016) 54-63]. *Trends Endocrinol Metab* 27 (5):348.
- [89] JM Zigman, SG Bouret, ZB Andrews (2016) Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends Endocrinol Metab* 27 (1):54-63.

- [90] M Perello, I Sakata, S Birnbaum, JC Chuang, S Osborne-Lawrence, SA Rovinsky, J Woloszyn, M Yanagisawa, M Lutter, JM Zigman (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry* 67 (9):880-886.
- [91] M Perello, SL Dickson (2015) Ghrelin signalling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system. *J Neuroendocrinol* 27 (6):424-434.
- [92] GJ Morton, TH Meek, MW Schwartz (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15 (6):367-378.
- [93] AC Reichelt, MJ Morris, RF Westbrook (2014) Cafeteria diet impairs expression of sensory-specific satiety and stimulus-outcome learning. *Front Psychol* 5:852.
- [94] BJ Rolls (1986) Sensory-specific satiety. *Nutr Rev* 44 (3):93-101.
- [95] KP Myers (2017) Sensory-specific satiety is intact in rats made obese on a high-fat high-sugar choice diet. *Appetite* 112:196-200.
- [96] HE Rischel, LA Nielsen, M Gamborg, P Moller, JC Holm (2016) Comparison of sensory-specific satiety between normal weight and overweight children. *Appetite* 107:486-493.
- [97] SI Martire, SL Parkes, RF Westbrook (2010) The effects of FG 7142 on sensory-specific satiety in rats. *Behav Brain Res* 209 (1):131-136.
- [98] V Trezza, PJ Baarendse, LJ Vanderschuren (2010) The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 31 (10):463-469.
- [99] DJ Calcagnetti, MD Schechter (1992) Place conditioning reveals the rewarding aspect of social interaction in juvenile rats. *Physiol Behav* 51 (4):667-672.
- [100] M Schumacher, S Weill-Engerer, P Liere, F Robert, RJ Franklin, LM Garcia-Segura, JJ Lambert, W Mayo, RC Melcangi, A Parducz, U Suter, C Carelli, EE Baulieu, Y Akwa (2003) Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol* 71 (1):3-29.
- [101] SH Mellon, LD Griffin (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab* 13 (1):35-43.
- [102] DS Reddy (2010) Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* 186:113-137.
- [103] JL Do Rego, JY Seong, D Burel, J Leprince, V Luu-The, K Tsutsui, MC Tonon, G Pelletier, H Vaudry (2009) Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol* 30 (3):259-301.
- [104] MF Rossetti, J Varayoud, GS Moreno-Piovano, EH Luque, JG Ramos (2015) Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state of the steroid 5alpha-reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol*.
- [105] WL Miller (1995) Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55 (5-6):607-616.
- [106] A Furukawa, A Miyatake, T Ohnishi, Y Ichikawa (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71 (6):2231-2238.
- [107] A Sierra (2004) Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *J Neuroendocrinol* 16 (9):787-793.
- [108] NA Compagnone, A Bulfone, JL Rubenstein, SH Mellon (1995) Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136 (6):2689-2696.
- [109] NA Compagnone, SH Mellon (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21 (1):1-56.
- [110] T Inoue, J Akahira, T Suzuki, AD Darnel, C Kaneko, K Takahashi, M Hatori, R Shirane, T Kumabe, Y Kurokawa, S Satomi, H Sasano (2002) Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (11):5325-5331.
- [111] TM Penning, H Ma, JM Jez (2001) Engineering steroid hormone specificity into aldo-keto reductases. *Chem Biol Interact* 130-132 (1-3):659-671.

- [112] F Labrie, V Luu-The, SX Lin, J Simard, C Labrie (2000) Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol Metab* 11 (10):421-427.
- [113] E Grueso, M Rocha, M Puerta (2001) Plasma and cerebrospinal fluid leptin levels are maintained despite enhanced food intake in progesterone-treated rats. *Eur J Endocrinol* 144 (6):659-665.
- [114] S Roberts, NJ Kenney, DG Mook (1972) Overeating induced by progesterone in the ovariectomized, adrenalectomized rat. *Horm Behav* 3 (3):267-276.
- [115] KT Nakhate, NK Subhedar, AP Bharme, PS Singru, DM Kokare (2013) Involvement of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the hyperphagic and body weight promoting effects of allopregnanolone in rats. *Brain Res* 1532:44-55.
- [116] E Holmberg, J Sjostedt, E Malinina, M Johansson, S Turkmen, G Ragagnin, A Lundqvist, M Lofgren, L Jaukkuri, M Bixo, T Backstrom (2018) Allopregnanolone involvement in feeding regulation, overeating and obesity. *Front Neuroendocrinol* 48:70-77.
- [117] DS Reddy, SK Kulkarni (1999) Sex and estrous cycle-dependent changes in neurosteroid and benzodiazepine effects on food consumption and plus-maze learning behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62 (1):53-60.
- [118] R Menozzi, P Florio, M Bondi, S Luisi, L Cobellis, AR Genazzani, G Del Rio, F Petraglia (2002) Increased response of plasma allopregnanolone to corticotropin-releasing hormone in obese patients. *Neuroendocrinology* 75 (2):124-129.
- [119] A Frank, LM Brown, DJ Clegg (2014) The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Front Neuroendocrinol*.
- [120] FS de Souza, S Nasif, R Lopez-Leal, DH Levi, MJ Low, M Rubinsten (2011) The estrogen receptor alpha colocalizes with proopiomelanocortin in hypothalamic neurons and binds to a conserved motif present in the neuron-specific enhancer nPE2. *Eur J Pharmacol* 660 (1):181-187.
- [121] F Mauvais-Jarvis, DJ Clegg, AL Hevener (2013) The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev* 34 (3):309-338.
- [122] A Dagnault, D Richard (1997) Involvement of the medial preoptic area in the anorectic action of estrogens. *Am J Physiol* 272 (1 Pt 2):R311-317.
- [123] R Barres, JR Zierath (2011) DNA methylation in metabolic disorders. *Am J Clin Nutr* 93 (4):897S-900.
- [124] A Marco, T Kisliouk, A Weller, N Meiri (2013) High fat diet induces hypermethylation of the hypothalamic Pomc promoter and obesity in post-weaning rats. *Psychoneuroendocrinology* 38 (12):2844-2853.
- [125] X Zhang, SM Ho (2011) Epigenetics meets endocrinology. *J Mol Endocrinol* 46 (1):R11-32.
- [126] R Holliday (1987) The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238 (4824):163-170.
- [127] S Tajima, I Suetake (1998) Regulation and function of DNA methylation in vertebrates. *J Biochem* 123 (6):993-999.
- [128] SJ Clark, J Melki (2002) DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21 (35):5380-5387.
- [129] DB Martinez-Arguelles, V Papadopoulos (2010) Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids* 75 (7):467-476.
- [130] FI Milagro, JA Martinez (2013) Epigenetics of obesity and weight loss. *Endocrinol Nutr* 60 Suppl 1:12-14.
- [131] A Plagemann, T Harder, M Brunn, A Harder, K Roepke, M Wittrock-Staar, T Ziska, K Schellong, E Rodekamp, K Melchior, JW Dudenhausen (2009) Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 587 (Pt 20):4963-4976.
- [132] Z Vucetic, J Kimmel, K Totoki, E Hollenbeck, TM Reyes (2010) Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 151 (10):4756-4764.
- [133] D Sanchez-Hernandez, AN Poon, R Kubant, H Kim, PS Huot, CE Cho, E Pannia, Z Pausova, GH Anderson (2015) A gestational diet high in fat-soluble vitamins alters expression of genes in brain pathways and reduces sucrose preference, but not food intake, in Wistar male rat offspring. *Appl Physiol Nutr Metab* 40 (4):424-431.

- [134] MF Rossetti, J Varayoud, GP Lazzarino, EH Luque, JG Ramos (2016) Pregnancy and lactation differentially modify the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes through DNA methylation mechanisms in the hippocampus of aged rats. *Mol Cell Endocrinol* 429:73-83.
- [135] G Di Chiara (2005) Dopamine in disturbances of food and drug motivated behavior: a case of homology? *Physiol Behav* 86 (1-2):9-10.
- [136] JF Lalanza, A Caimari, JM del Bas, D Torregrosa, I Cigarroa, M Pallas, L Capdevila, L Arola, RM Escorihuela (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.
- [137] R Buettner, J Scholmerich, LC Bollheimer (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15 (4):798-808.
- [138] BP Sampey, AM Vanhoose, HM Winfield, AJ Freerman, MJ Muehlbauer, PT Fueger, CB Newgard, L Makowski (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 19 (6):1109-1117.
- [139] (2011). En: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Washington (DC).
- [140] BD Kretschmer, P Schelling, N Beier, C Liebscher, S Treutel, N Kruger, HP Scholz, A Haus (2005) Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci* 76 (14):1553-1573.
- [141] SI Martire, N Holmes, RF Westbrook, MJ Morris (2013) Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS One* 8 (4):e60407.
- [142] GS Montes, EH Luque (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)* 133 (3):192-199.
- [143] RT Mitchell, W Mungall, C McKinnell, RM Sharpe, L Cruickshanks, L Milne, LB Smith (2015) Anogenital distance plasticity in adulthood: implications for its use as a biomarker of fetal androgen action. *Endocrinology* 156 (1):24-31.
- [144] MF Andreoli, MV Scalerandi, IM Borel, CA Bernal (2007) Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion. *Nutrition* 23 (11-12):827-835.
- [145] YY Wang, SY Lin, YH Chuang, CJ Chen, KC Tung, WH Sheu (2011) Adipose proinflammatory cytokine expression through sympathetic system is associated with hyperglycemia and insulin resistance in a rat ischemic stroke model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300 (1):E155-163.
- [146] JC MacKay, JS James, C Cayer, P Kent, H Anisman, Z Merali (2014) Protracted effects of juvenile stressor exposure are mitigated by access to palatable food. *PLoS One* 9 (5):e96573.
- [147] ML Seibenhener, MC Wooten (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* (96):e52434.
- [148] JP Voigt, H Hortnagl, A Rex, L van Hove, M Bader, H Fink (2005) Brain angiotensin and anxiety-related behavior: the transgenic rat TGR(ASrAOGEN)680. *Brain Res* 1046 (1-2):145-156.
- [149] SE File, P Seth (2003) A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 463 (1-3):35-53.
- [150] KE Beale, JS Kinsey-Jones, JV Gardiner, EK Harrison, EL Thompson, MH Hu, ML Sleeth, AH Sam, HC Greenwood, AK McGavigan, WS Dhillon, JM Mora, XF Li, S Franks, SR Bloom, KT O'Byrne, KG Murphy (2014) The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology* 155 (3):1091-1098.
- [151] M Palkovits, MJ Brownstein (1988) *Maps and guide to microdissection of the rat brain*. Elsevier, New York.
- [152] G Paxinos, C Watson (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press, New York.
- [153] G Paxinos, KW Ashwell (2008) *Atlas of the Developing Rat Nervous System*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- [154] R Khazipov, D Zaynutdinova, E Ogievetsky, G Valeeva, O Mitrukhnina, JB Manent, A Represa (2015) Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Front Neuroanat* 9:161.

- [155] A Giovambattista, J Piermaria, MO Suescun, RS Calandra, RC Gaillard, E Spinedi (2006) Direct effect of ghrelin on leptin production by cultured rat white adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 14 (1):19-27.
- [156] DR Matthews, JP Hosker, AS Rudenski, BA Naylor, DF Treacher, RC Turner (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 (7):412-419.
- [157] R Higuchi, C Fockler, G Dollinger, R Watson (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11 (9):1026-1030.
- [158] S Cikos, A Bukovska, J Koppel (2007) Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 8:113.
- [159] PA Melas, A Lennartsson, H Vakifahmetoglu-Norberg, Y Wei, E Aberg, M Werme, M Rogdaki, M Mannervik, G Wegener, S Brene, AA Mathe, C Lavebratt (2013) Allele-specific programming of Npy and epigenetic effects of physical activity in a genetic model of depression. *Transl Psychiatry* 3:e255.
- [160] FS de Souza, AM Santangelo, V Bumashny, ME Avale, JL Smart, MJ Low, M Rubinstein (2005) Identification of neuronal enhancers of the proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting. *Mol Cell Biol* 25 (8):3076-3086.
- [161] E Missaghian, P Kempna, B Dick, A Hirsch, R Alikhani-Koupaei, B Jegou, PE Mullis, BM Frey, CE Fluck (2009) Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *J Endocrinol* 202 (1):99-109.
- [162] X Messeguer, R Escudero, D Farre, O Nunez, J Martinez, MM Alba (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18 (2):333-334.
- [163] M Munoz de Toro, MV Maffini, RH Giardina, EH Luque (1998) Processing fine needle aspirates of prostate carcinomas for standard immunocytochemical studies and in situ apoptosis detection. *Pathol Res Pract* 194 (9):631-636.
- [164] EyL Harlow, D. (2014) *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- [165] J Vaitukaitis, JB Robbins, E Nieschlag, GT Ross (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab* 33 (6):988-991.
- [166] N Hariri, L Thibault (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23 (2):270-299.
- [167] TA Lutz, SC Woods (2012) Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 5:Unit5 61.
- [168] SE la Fleur, MC Luijendijk, EM van der Zwaal, MA Brans, RA Adan (2014) The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. *Int J Obes (Lond)* 38 (5):643-649.
- [169] J Ribot, AM Rodriguez, E Rodriguez, A Palou (2008) Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity (Silver Spring)* 16 (4):723-730.
- [170] KA Posey, DJ Clegg, RL Printz, J Byun, GJ Morton, A Vivekanandan-Giri, S Pennathur, DG Baskin, JW Heinecke, SC Woods, MW Schwartz, KD Niswender (2009) Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (5):E1003-1012.
- [171] M Palou, C Pico, JA McKay, J Sanchez, T Priego, JC Mathers, A Palou (2011) Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *Br J Nutr* 106 (5):769-778.
- [172] DD Lam, FS de Souza, S Nasif, M Yamashita, R Lopez-Leal, V Otero-Corchon, K Meece, H Sampath, AJ Mercer, SL Wardlaw, M Rubinstein, MJ Low (2015) Partially redundant enhancers cooperatively maintain mammalian pomc expression above a critical functional threshold. *PLoS Genet* 11 (2):e1004935.
- [173] O Gozen, B Balkan, E Yildirim, EO Koylu, S Pogun (2013) The epigenetic effect of nicotine on dopamine D1 receptor expression in rat prefrontal cortex. *Synapse* 67 (9):545-552.
- [174] UM D'Souza (2010) 2 Gene and Promoter Structures of the Dopamine Receptors. En: *The Dopamine Receptors, 2nd edition*, Humana Press.
- [175] HR Berthoud (2011) Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21 (6):888-896.

- [176] GN Wade (1986) Sex steroids and energy balance: sites and mechanisms of action. *Ann N Y Acad Sci* 474:389-399.
- [177] IC Macedo, LF Medeiros, C Oliveira, CM Oliveira, JR Rozisky, VL Scarabelot, A Souza, FR Silva, VS Santos, SG Cioato, W Caumo, IL Torres (2012) Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38 (1):189-196.
- [178] E Prats, M Monfar, J Castella, R Iglesias, M Alemany (1989) Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav* 45 (2):263-272.
- [179] JF Goularte, MB Ferreira, GL Sanvito (2012) Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr* 108 (8):1511-1518.
- [180] SC Sagae, EF Menezes, ML Bonfleur, EC Vanzela, P Zacharias, C Lubaczewski, CR Franci, GL Sanvito (2012) Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiol Behav* 105 (5):1104-1111.
- [181] M Enesco, P Leblond (1962) Increase in cell number as factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morph* 10 (4):530-562.
- [182] M Gomez-Smith, S Karthikeyan, MS Jeffers, R Janik, LA Thomason, B Stefanovic, D Corbett (2016) A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* 167:382-391.
- [183] D Estadella, LM Oyama, AR Damaso, EB Ribeiro, CM Oller Do Nascimento (2004) Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20 (2):218-224.
- [184] J Alsio, PK Olszewski, AH Norback, ZE Gunnarsson, AS Levine, C Pickering, HB Schioth (2010) Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience* 171 (3):779-787.
- [185] RC Bortolin, AR Vargas, J Gasparotto, PR Chaves, CE Schnorr, KB Martinello, AK Silveira, TK Rabelo, DP Gelain, JCF Moreira (2018) A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond)* 42 (3):525-534.
- [186] M Naim, JG Brand, MR Kare, RG Carpenter (1985) Energy intake, weight gain and fat deposition in rats fed flavored, nutritionally controlled diets in a multichoice ("cafeteria") design. *J Nutr* 115 (11):1447-1458.
- [187] TS Higa, AV Spinola, MH Fonseca-Alaniz, FS Evangelista (2014) Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 6 (1):47-54.
- [188] PM Johnson, PJ Kenny (2010) Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci* 13 (5):635-641.
- [189] ZY Ong, AF Wanasuria, MZ Lin, J Hiscock, BS Muhlhausler (2013) Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite* 65:189-199.
- [190] A Shafat, B Murray, D Rumsey (2009) Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 52 (1):34-38.
- [191] JA Desor, GK Beauchamp (1987) Longitudinal changes in sweet preferences in humans. *Physiol Behav* 39 (5):639-641.
- [192] M Bertino, F Wehmer (1981) Dietary influences on the development of sucrose acceptability in rats. *Dev Psychobiol* 14 (1):19-28.
- [193] MY Pepino, SA Eisenstein, AN Bischoff, S Klein, SM Moerlein, JS Perlmutter, KJ Black, T Hershey (2016) Sweet Dopamine: Sucrose Preferences Relate Differentially to Striatal D2 Receptor Binding and Age in Obesity. *Diabetes* 65 (9):2618-2623.
- [194] MA Cornier, ME Shott, EA Thomas, JL Bechtell, DH Bessesen, JR Tregellas, GK Frank (2015) The effects of energy balance, obesity-proneness and sex on the neuronal response to sweet taste. *Behav Brain Res* 278:446-452.
- [195] M Esteve, I Rafecas, JA Fernandez-Lopez, X Remesar, M Alemany (1994) Effect of a cafeteria diet on energy intake and balance in Wistar rats. *Physiol Behav* 56 (1):65-71.
- [196] NJ Rothwell, ME Saville, MJ Stock (1982) Effects of feeding a "cafeteria" diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rat. *J Nutr* 112 (8):1515-1524.

- [197] EA Fox (2006) A genetic approach for investigating vagal sensory roles in regulation of gastrointestinal function and food intake. *Auton Neurosci* 126-127:9-29.
- [198] J Maniam, MJ Morris (2010) Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35 (5):717-728.
- [199] AB Mucellini, JF Goularte, AC de Araujo da Cunha, RC Caceres, C Noschang, C da Silva Benetti, PP Silveira, GL Sanvito (2014) Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. *Br J Nutr* 111 (8):1499-1506.
- [200] P Pedrazzi, L Cattaneo, L Valeriani, S Boschi, D Cocchi, M Zoli (1998) Hypothalamic neuropeptide Y and galanin in overweight rats fed a cafeteria diet. *Peptides* 19 (1):157-165.
- [201] C Breton (2013) The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J Endocrinol* 216 (2):R19-31.
- [202] Y Zhang, PJ Scarpace (2006) The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 88 (3):249-256.
- [203] KP Kinzig, KA Scott, J Hyun, S Bi, TH Moran (2005) Altered hypothalamic signaling and responses to food deprivation in rats fed a low-carbohydrate diet. *Obes Res* 13 (10):1672-1682.
- [204] B Tiesjema, SE la Fleur, MC Luijendijk, RA Adan (2009) Sustained NPY overexpression in the PVN results in obesity via temporarily increasing food intake. *Obesity (Silver Spring)* 17 (7):1448-1450.
- [205] JP Wilding, SG Gilbey, M Mannan, N Aslam, MA Ghatei, SR Bloom (1992) Increased neuropeptide Y content in individual hypothalamic nuclei, but not neuropeptide Y mRNA, in diet-induced obesity in rats. *J Endocrinol* 132 (2):299-304.
- [206] S Dryden, L Pickavance, HM Frankish, G Williams (1995) Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res* 690 (2):185-188.
- [207] G Sanacora, M Kershaw, JA Finkelstein, JD White (1990) Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127 (2):730-737.
- [208] G Williams, C Bing, XJ Cai, JA Harrold, PJ King, XH Liu (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74 (4-5):683-701.
- [209] JE Morley, AS Levine, BA Gosnell, J Kneip, M Grace (1987) Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol* 252 (3 Pt 2):R599-609.
- [210] BK Smith, HR Berthoud, DA York, GA Bray (1997) Differential effects of baseline macronutrient preferences on macronutrient selection after galanin, NPY, and an overnight fast. *Peptides* 18 (2):207-211.
- [211] B Beck (2006) Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1471):1159-1185.
- [212] BG Stanley, KC Anderson, MH Grayson, SF Leibowitz (1989) Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav* 46 (2):173-177.
- [213] JK van den Heuvel, L Eggels, AJ van Rozen, MC Luijendijk, E Fliers, A Kalsbeek, RA Adan, SE la Fleur (2014) Neuropeptide Y and leptin sensitivity is dependent on diet composition. *J Neuroendocrinol* 26 (6):377-385.
- [214] PB Goforth, MG Myers (2017) Roles for Orexin/Hypocretin in the Control of Energy Balance and Metabolism. *Curr Top Behav Neurosci* 33:137-156.
- [215] GD Stuber, RA Wise (2016) Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19 (2):198-205.
- [216] GM Leininger, DM Opland, YH Jo, M Faouzi, L Christensen, LA Cappellucci, CJ Rhodes, ME Gnegy, JB Becker, EN Pothos, AF Seasholtz, RC Thompson, MG Myers, Jr. (2011) Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metab* 14 (3):313-323.
- [217] H Zheng, LM Patterson, HR Berthoud (2007) Orexin signaling in the ventral tegmental area is required for high-fat appetite induced by opioid stimulation of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 27 (41):11075-11082.

- [218] AB Crujeiras, J Campion, A Diaz-Lagares, FI Milagro, E Goyenechea, I Abete, FF Casanueva, JA Martinez (2013) Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. *Regul Pept* 186:1-6.
- [219] L Paternain, MA Batlle, AL De la Garza, FI Milagro, JA Martinez, J Campion (2012) Transcriptomic and epigenetic changes in the hypothalamus are involved in an increased susceptibility to a high-fat-sucrose diet in prenatally stressed female rats. *Neuroendocrinology* 96 (3):249-260.
- [220] H Munzberg, L Huo, EA Nillni, AN Hollenberg, C Bjorbaek (2003) Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144 (5):2121-2131.
- [221] G Yang, CY Lim, C Li, X Xiao, GK Radda, X Cao, W Han (2009) FoxO1 inhibits leptin regulation of pro-opiomelanocortin promoter activity by blocking STAT3 interaction with specificity protein 1. *J Biol Chem* 284 (6):3719-3727.
- [222] S Mahmood, DJ Smiraglia, M Srinivasan, MS Patel (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. *J Dev Orig Health Dis* 4 (6):479-490.
- [223] BS Li, PR Kramer, W Zhao, W Ma, DA Stenger, L Zhang (2000) Molecular cloning, expression, and characterization of rat homolog of human AP-2alpha that stimulates neuropeptide Y transcription activity in response to nerve growth factor. *Mol Endocrinol* 14 (6):837-847.
- [224] L Kappeler, D Gourdj, P Zizzari, MT Bluet-Pajot, J Epelbaum (2003) Age-associated changes in hypothalamic and pituitary neuroendocrine gene expression in the rat. *J Neuroendocrinol* 15 (6):592-601.
- [225] DA Gruenewald, BT Marck, AM Matsumoto (1996) Fasting-induced increases in food intake and neuropeptide Y gene expression are attenuated in aging male brown Norway rats. *Endocrinology* 137 (10):4460-4467.
- [226] EH Sohn, T Wolden-Hanson, AM Matsumoto (2002) Testosterone (T)-induced changes in arcuate nucleus cocaine-amphetamine-regulated transcript and NPY mRNA are attenuated in old compared to young male brown Norway rats: contribution of T to age-related changes in cocaine-amphetamine-regulated transcript and NPY gene expression. *Endocrinology* 143 (3):954-963.
- [227] N Furedi, A Miko, B Gaszner, D Feller, I Rostas, J Tenk, M Solymar, M Balasko, E Petervari (2018) Activity of the Hypothalamic Melanocortin System Decreases in Middle-Aged and Increases in Old Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 73 (4):438-445.
- [228] I Rostas, J Tenk, A Miko, N Furedi, S Soos, M Solymar, A Lengyel, M Szekely, B Gaszner, D Feller, E Petervari, M Balasko (2016) Age-related changes in acute central leptin effects on energy balance are promoted by obesity. *Exp Gerontol* 85:118-127.
- [229] PJ Scarpace, M Matheny, RL Moore, N Tumer (2000) Impaired leptin responsiveness in aged rats. *Diabetes* 49 (3):431-435.
- [230] H Munzberg, MG Myers, Jr. (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8 (5):566-570.
- [231] GJ Wang, ND Volkow, J Logan, NR Pappas, CT Wong, W Zhu, N Netusil, JS Fowler (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet* 357 (9253):354-357.
- [232] DE Comings, R Gade, JP MacMurray, D Muhleman, WR Peters (1996) Genetic variants of the human obesity (OB) gene: association with body mass index in young women, psychiatric symptoms, and interaction with the dopamine D2 receptor (DRD2) gene. *Mol Psychiatry* 1 (4):325-335.
- [233] LH Epstein, JL Temple, BJ Neaderhiser, RJ Salis, RW Erbe, JJ Leddy (2007) Food reinforcement, the dopamine D2 receptor genotype, and energy intake in obese and nonobese humans. *Behav Neurosci* 121 (5):877-886.
- [234] EP Noble (2003) D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 116B (1):103-125.
- [235] PJ Kenny, G Voren, PM Johnson (2013) Dopamine D2 receptors and striatopallidal transmission in addiction and obesity. *Curr Opin Neurobiol* 23 (4):535-538.
- [236] O Arias-Carrion, M Stamelou, E Murillo-Rodriguez, M Menendez-Gonzalez, E Poppel (2010) Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* 3:24.

- [237] BB Gore, LS Zweifel (2013) Genetic reconstruction of dopamine D1 receptor signaling in the nucleus accumbens facilitates natural and drug reward responses. *J Neurosci* 33 (20):8640-8649.
- [238] PJ Hernandez, ME Andrzejewski, K Sadeghian, JB Panksepp, AE Kelley (2005) AMPA/kainate, NMDA, and dopamine D1 receptor function in the nucleus accumbens core: a context-limited role in the encoding and consolidation of instrumental memory. *Learn Mem* 12 (3):285-295.
- [239] S Bernal, P Miner, Y Abayev, E Kandova, M Gerges, K Touzani, A Sclafani, RJ Bodnar (2009) Role of amygdala dopamine D1 and D2 receptors in the acquisition and expression of fructose-conditioned flavor preferences in rats. *Behav Brain Res* 205 (1):183-190.
- [240] ME Andrzejewski, RC Spencer, AE Kelley (2005) Instrumental learning, but not performance, requires dopamine D1-receptor activation in the amygdala. *Neuroscience* 135 (2):335-345.
- [241] SE Ross, E Lehmann Levin, CA Itoga, CB Schoen, R Selmane, JW Aldridge (2016) Deep brain stimulation in the central nucleus of the amygdala decreases 'wanting' and 'liking' of food rewards. *Eur J Neurosci* 44 (7):2431-2445.
- [242] S Koyama, M Kawaharada, H Terai, M Ohkurano, M Mori, S Kanamaru, S Hirose (2013) Obesity decreases excitability of putative ventral tegmental area GABAergic neurons. *Physiol Rep* 1 (5):e00126.
- [243] S Koyama, M Mori, S Kanamaru, T Sazawa, A Miyazaki, H Terai, S Hirose (2014) Obesity attenuates D2 autoreceptor-mediated inhibition of putative ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Physiol Rep* 2 (5):e12004.
- [244] N Omelchenko, SR Sesack (2009) Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* 63 (10):895-906.
- [245] C Luscher, RC Malenka (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69 (4):650-663.
- [246] KR Tan, M Brown, G Labouebe, C Yvon, C Creton, JM Fritschy, U Rudolph, C Luscher (2010) Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature* 463 (7282):769-774.
- [247] SN Haber, HJ Groenewegen, EA Grove, WJ Nauta (1985) Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *J Comp Neurol* 235 (3):322-335.
- [248] Y Xia, JR Driscoll, L Wilbrecht, EB Margolis, HL Fields, GO Hjelmstad (2011) Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 31 (21):7811-7816.
- [249] GO Hjelmstad, Y Xia, EB Margolis, HL Fields (2013) Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *J Neurosci* 33 (15):6454-6459.
- [250] Z Vucetic, JL Carlin, K Totoki, TM Reyes (2012) Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity. *J Neurochem* 120 (6):891-898.
- [251] S Pecina, KC Berridge (2005) Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci* 25 (50):11777-11786.
- [252] Z Vucetic, J Kimmel, TM Reyes (2011) Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of mu-opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology* 36 (6):1199-1206.
- [253] SL Smith, JA Harrold, G Williams (2002) Diet-induced obesity increases mu opioid receptor binding in specific regions of the rat brain. *Brain Res* 953 (1-2):215-222.
- [254] KM Wassum, SB Ostlund, NT Maidment, BW Balleine (2009) Distinct opioid circuits determine the palatability and the desirability of rewarding events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (30):12512-12517.
- [255] DJ Clegg, EL Air, SC Woods, RJ Seeley (2002) Eating elicited by orexin-a, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. *Endocrinology* 143 (8):2995-3000.
- [256] GD Petrovich, PC Holland, M Gallagher (2005) Amygdalar and prefrontal pathways to the lateral hypothalamus are activated by a learned cue that stimulates eating. *J Neurosci* 25 (36):8295-8302.
- [257] MF Areias, PO Prada (2015) Mechanisms of insulin resistance in the amygdala: influences on food intake. *Behav Brain Res* 282:209-217.

- [258] S Malik, F McGlone, D Bedrossian, A Dagher (2008) Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell Metab* 7 (5):400-409.
- [259] AM Cason, RJ Smith, P Tahsili-Fahadan, DE Moorman, GC Sartor, G Aston-Jones (2010) Role of orexin/hypocretin in reward-seeking and addiction: implications for obesity. *Physiol Behav* 100 (5):419-428.
- [260] JM Rorabaugh, JM Stratford, NR Zahniser (2014) A relationship between reduced nucleus accumbens shell and enhanced lateral hypothalamic orexin neuronal activation in long-term fructose bingeing behavior. *PLoS One* 9 (4):e95019.
- [261] CY Ho, KC Berridge (2013) An orexin hotspot in ventral pallidum amplifies hedonic 'liking' for sweetness. *Neuropsychopharmacology* 38 (9):1655-1664.
- [262] MT Cruz, MA Herman, DM Cote, AE Ryabinin, M Roberto (2013) Ghrelin increases GABAergic transmission and interacts with ethanol actions in the rat central nucleus of the amygdala. *Neuropsychopharmacology* 38 (2):364-375.
- [263] DP Figlewicz (2003) Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 (4):R882-892.
- [264] DP Figlewicz, SC Benoit (2009) Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296 (1):R9-R19.
- [265] Z Han, JQ Yan, GG Luo, Y Liu, YL Wang (2003) Leptin receptor expression in the basolateral nucleus of amygdala of conditioned taste aversion rats. *World J Gastroenterol* 9 (5):1034-1037.
- [266] A Lee, C Owyang (2017) Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients*9(7).
- [267] S Ahn, AG Phillips (2012) Repeated cycles of restricted food intake and binge feeding disrupt sensory-specific satiety in the rat. *Behav Brain Res* 231 (2):279-285.
- [268] SL Parkes, TM Furlong, F Naneix (2015) Commentary: Cafeteria diet impairs expression of sensory-specific satiety and stimulus-outcome learning. *Front Psychol* 6:536.
- [269] HA Raynor, LH Epstein (2001) Dietary variety, energy regulation, and obesity. *Psychol Bull* 127 (3):325-341.
- [270] LJ Vanderschuren, V Trezza, S Griffioen-Roose, OJ Schiepers, N Van Leeuwen, TJ De Vries, AN Schoffeleer (2008) Methylphenidate disrupts social play behavior in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology* 33 (12):2946-2956.
- [271] CK Lee, R Weindruch, TA Prolla (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 25 (3):294-297.
- [272] TJ Collier, J Lipton, BF Daley, S Palfi, Y Chu, C Sortwell, RA Bakay, JR Sladek, Jr., JH Kordower (2007) Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. *Neurobiol Dis* 26 (1):56-65.
- [273] O Darbin (2012) The aging striatal dopamine function. *Parkinsonism Relat Disord* 18 (5):426-432.
- [274] R Quinn (2005) Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21 (6):775-777.
- [275] S Della Torre, V Benedusi, R Fontana, A Maggi (2014) Energy metabolism and fertility: a balance preserved for female health. *Nat Rev Endocrinol* 10 (1):13-23.
- [276] MA Arevalo, I Azcoitia, LM Garcia-Segura (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci* 16 (1):17-29.
- [277] ME Jones, AW Thorburn, KL Britt, KN Hewitt, NG Wreford, J Proietto, OK Oz, BJ Leury, KM Robertson, S Yao, ER Simpson (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (23):12735-12740.
- [278] LM Brown, DJ Clegg (2010) Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122 (1-3):65-73.
- [279] D Stanic, S Dubois, HK Chua, B Tonge, N Rinehart, MK Horne, WC Boon (2014) Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors alpha and beta, and androgen receptors. *PLoS One* 9 (3):e90451.

- [280] F Naftolin, TL Horvath, RL Jakab, C Leranath, N Harada, J Balthazart (1996) Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology* 63 (2):149-155.
- [281] M Schumacher, C Mattern, A Ghoumari, JP Oudinet, P Liere, F Labombarda, R Sitruk-Ware, AF De Nicola, R Guennoun (2014) Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog Neurobiol* 113:6-39.
- [282] S Saredi, C Patte-Mensah, RC Melcangi, AG Mensah-Nyagan (2005) Effect of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat spinal cord. *Neuroscience* 135 (3):869-877.
- [283] E Holmberg, M Johansson, T Backstrom, D Haage (2014) Allopregnanolone preferentially induces energy-rich food intake in male Wistar rats. *Physiol Rep* 2 (12).
- [284] E Dong, K Matsumoto, V Uzunova, I Sugaya, H Takahata, H Nomura, H Watanabe, E Costa, A Guidotti (2001) Brain 5alpha-dihydroprogesterone and allopregnanolone synthesis in a mouse model of protracted social isolation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (5):2849-2854.
- [285] F Rouge-Pont, W Mayo, M Marinelli, M Gingras, M Le Moal, PV Piazza (2002) The neurosteroid allopregnanolone increases dopamine release and dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 16 (1):169-173.
- [286] V Bassareo, G Di Chiara (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17 (2):851-861.
- [287] Y Shimogawa, Y Sakuma, K Yamanouchi (2015) Efferent and afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus determined by neural tracer analysis: implications for lordosis regulation in female rats. *Neurosci Res* 91:19-33.
- [288] Y Tsuruo, T Miyamoto, H Yokoi, K Kitagawa, S Futaki, K Ishimura (1996) Immunohistochemical presence of 5 alpha-reductase rat type 1-containing cells in the rat brain. *Brain Res* 722 (1-2):207-211.
- [289] RC Melcangi, F Celotti, P Castano, L Martini (1993) Differential localization of the 5 alpha-reductase and the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. *Endocrinology* 132 (3):1252-1259.
- [290] Y Hojo, S Higo, S Kawato, Y Hatanaka, Y Ooishi, G Murakami, H Ishii, Y Komatsuzaki, M Ogiue-Ikeda, H Mukai, T Kimoto (2011) Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2:43.
- [291] Y Blanchard, S Seenundun, B Robaire (2007) The promoter of the rat 5alpha-reductase type 1 gene is bidirectional and Sp1-dependent. *Mol Cell Endocrinol* 264 (1-2):171-183.
- [292] WG Zhu, K Srinivasan, Z Dai, W Duan, LJ Druhan, H Ding, L Yee, MA Villalona-Calero, C Plass, GA Otterson (2003) Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Mol Cell Biol* 23 (12):4056-4065.
- [293] C Stocco (2008) Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73 (5):473-487.
- [294] SL Fitzpatrick, JS Richards (1994) Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Mol Endocrinol* 8 (10):1309-1319.
- [295] MD Michael, LF Michael, ER Simpson (1997) A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol Cell Endocrinol* 134 (2):147-156.
- [296] M Demura, SE Bulun (2008) CpG dinucleotide methylation of the CYP19 I.3/II promoter modulates cAMP-stimulated aromatase activity. *Mol Cell Endocrinol* 283 (1-2):127-132.
- [297] HK Lin, TM Penning (1995) Cloning, sequencing, and functional analysis of the 5'-flanking region of the rat 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase gene. *Cancer Res* 55 (18):4105-4113.
- [298] GD Moreno-Piovanio, C.; Rossetti, M.F.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2010) Age-related changes in hippocampal estrogen receptor alpha in female mice. *Córdoba, Argentina*:146.
- [299] JR Gugusheff, ZY Ong, BS Muhlhauser (2015) The early origins of food preferences: targeting the critical windows of development. *FASEB J* 29 (2):365-373.

- [300] RH Purcell, B Sun, LL Pass, ML Power, TH Moran, KL Tamashiro (2011) Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 104 (3):474-479.
- [301] I Llado, C Pico, A Palou, A Pons (1995) Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiol Behav* 58 (3):513-519.
- [302] F Bieswal, MT Ahn, B Reusens, P Holvoet, M Raes, WD Rees, C Remacle (2006) The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* 14 (8):1330-1343.
- [303] SC Langley-Evans, M Nwagwu (1998) Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci* 63 (7):605-615.
- [304] BA Rolls, MI Gurr, PM van Duijvenvoorde, BJ Rolls, EA Rowe (1986) Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol Behav* 38 (2):185-190.
- [305] MA Vithayathil, JR Gugusheff, RA Gibson, ZY Ong, BS Muhlhauser (2016) Effect of a maternal cafeteria diet on the fatty acid composition of milk and offspring red blood cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 109:58-65.
- [306] AP Pine, NS Jessop, JD Oldham (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. *Br J Nutr* 72 (6):815-830.
- [307] MR Grigor, JE Allan, JM Carrington, A Carne, A Geursen, D Young, MP Thompson, EB Haynes, RA Coleman (1987) Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. *J Nutr* 117 (7):1247-1258.
- [308] MZ Alfaradhi, SE Ozanne (2011) Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet* 2:27.
- [309] S Rajia, H Chen, MJ Morris (2010) Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol* 22 (8):905-914.
- [310] S Fahrenkrog, T Harder, E Stolaczyk, K Melchior, K Franke, JW Dudenhausen, A Plagemann (2004) Cross-fostering to diabetic rat dams affects early development of mediobasal hypothalamic nuclei regulating food intake, body weight, and metabolism. *J Nutr* 134 (3):648-654.
- [311] SG Bouret (2013) Organizational actions of metabolic hormones. *Front Neuroendocrinol* 34 (1):18-26.
- [312] CM Reynolds, SA Segovia, MH Vickers (2017) Experimental Models of Maternal Obesity and Neuroendocrine Programming of Metabolic Disorders in Offspring. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:245.
- [313] TM Wright, KC Fone, SC Langley-Evans, JP Voigt (2011) Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci* 29 (8):785-793.
- [314] F Georges, E Normand, B Bloch, C Le Moine (1998) Opioid receptor gene expression in the rat brain during ontogeny, with special reference to the mesostriatal system: an in situ hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res* 109 (2):187-199.
- [315] R Guennoun, B Bloch (1991) D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum during ontogeny: an in situ hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res* 60 (1):79-87.
- [316] J Antonopoulos, I Dori, A Dinopoulos, M Chiotelli, JG Parnavelas (2002) Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience* 110 (2):245-256.
- [317] B Berger, C Verney, P Gaspar, A Febvret (1985) Transient expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in some neurons of the rat neocortex during postnatal development. *Brain Res* 355 (1):141-144.
- [318] JM Burgunder, WS Young, 3rd (1990) Ontogeny of tyrosine hydroxylase and cholecystokinin gene expression in the rat mesencephalon. *Brain Res Dev Brain Res* 52(1):85-93.
- [319] F Marin, MT Herrero, S Vyas, L Puelles (2005) Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA expression in mid- and forebrain: neuromeric pattern and novel positive regions. *Dev Dyn* 234 (3):709-717.

- [320] UB Schambra, GE Duncan, GR Breese, MG Fornaretto, MG Caron, RT Fremeau, Jr. (1994) Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience* 62 (1):65-85.
- [321] FI Tarazi, RJ Baldessarini (2000) Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int J Dev Neurosci* 18 (1):29-37.
- [322] L Galineau, E Kodas, D Guilloteau, MP Vilar, S Chalon (2004) Ontogeny of the dopamine and serotonin transporters in the rat brain: an autoradiographic study. *Neurosci Lett* 363 (3):266-271.
- [323] M Fujita, S Shimada, T Nishimura, GR Uhl, M Tohyama (1993) Ontogeny of dopamine transporter mRNA expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 19 (3):222-226.
- [324] L Naef, L Srivastava, A Gratton, H Hendrickson, SM Owens, CD Walker (2008) Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 197 (1):83-94.
- [325] S Murray, A Tulloch, MS Gold, NM Avena (2014) Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 10 (9):540-552.
- [326] SM Steculorum, SG Bouret (2011) Developmental effects of ghrelin. *Peptides* 32 (11):2362-2366.
- [327] JP Chanoine, K De Waele, P Walia (2009) Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor in growth and development. *Int J Obes (Lond)* 33 Suppl 1:S48-52.
- [328] JW de Jong, TJ Roelofs, FM Mol, AE Hillen, KE Meijboom, MC Luijendijk, HA van der Eerden, KM Garner, LJ Vanderschuren, RA Adan (2015) Reducing Ventral Tegmental Dopamine D2 Receptor Expression Selectively Boosts Incentive Motivation. *Neuropsychopharmacology* 40 (9):2085-2095.
- [329] UM D'Souza, A Kel, F Sluyter (2003) From transcriptional regulation to aggressive behavior. *Behav Genet* 33 (5):549-562.
- [330] RA Hipskind, VN Rao, CG Mueller, ES Reddy, A Nordheim (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354 (6354):531-534.
- [331] C Perrone-Capano, U Di Porzio (2000) Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int J Dev Biol* 44 (6):679-687.
- [332] AL Green, MM Hossain, SC Tee, H Zarbl, GL Guo, JR Richardson (2015) Epigenetic Regulation of Dopamine Transporter mRNA Expression in Human Neuroblastoma Cells. *Neurochem Res* 40 (7):1372-1378.
- [333] MS Dicken, AR Hughes, ST Hentges (2015) Gad1 mRNA as a reliable indicator of altered GABA release from orexigenic neurons in the hypothalamus. *Eur J Neurosci* 42 (9):2644-2653.
- [334] MC Creed, NR Ntamati, KR Tan (2014) VTA GABA neurons modulate specific learning behaviors through the control of dopamine and cholinergic systems. *Front Behav Neurosci* 8:8.
- [335] ND Volkow, GJ Wang, RD Baler (2011) Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci* 15 (1):37-46.
- [336] WP Eechoute, WS Dhooge, CQ Gao, P Calders, R Rubens, J Weyne, JM Kaufman (1999) Progesterone-transforming enzyme activity in the hypothalamus of the male rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70 (4-6):159-167.
- [337] ME Lauber, W Lichtensteiger (1994) Pre- and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in the male rat brain studied by in situ hybridization. *Endocrinology* 135 (4):1661-1668.