



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Raquel
Pérez Lois

Tese de doutoramento

Identificación de nuevas dianas
metabólicas de la lactancia
prolongada

Santiago de Compostela, 2024

Programa de Doutoramento en Endocrinoloxía

TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS METABÓLICAS DE LA LACTANCIA PROLONGADA

Autor

Raquel Pérez Lois

Directores: Luisa María Seoane Camino y Omar Al-Massadi Iglesias

Tutor/a: Rubén Nogueiras Pozo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

Agradecementos

Considero que unha tese non é froito da intelixencia nin da vocación, creo que ten máis que ver co puro desexo de aprender, e foron moitos dos que aprendín para poder escribir esta tese, a todos lles estou agradecida.

Agradézollo ós meus pais, a miña rede de seguridade, os que me regalaron un fogar ó que sempre volvo, ó meu irmán, á súa voz franca e cabal que tantas veces me desengana, á miña familia en xeral que me quere e me apoia. Agradézolle á miña amiga por conveniencia xeográfica, Melisa, a aquelas coas que aprendín a facer proxectos, Thaly, Tania, Alba, Yas e Ana, e co que aprendín a discutir, Dani. Agradézolle a Aurora que me presentase a Bioloxía, e a miña desorientación que me deixara dar tantas voltas para volver a ela. Agradézolle ás que me acompañaron formándome, a Ana, Adriana, e Sara, e agradézolle a Rosie que me ensinara o inglés que tanta falta me fixo. Gracias ós profesores que me marcaron e ó sistema educativo que tanto faía pero me trouxo ata aquí.

Gracias a Silvia aterrei no laboratorio, gracias á Ceci non envorqueei e gracias a Vero aprendín a voar soa, a ser profesional, a ser investigadora. Pensando nelas decidín probar co doutorado. Gracias a Sisi que me dou a oportunidade, gracias ós seus ánimos, ó seu positivismo cando eu só vexo erros e imposibles. Gracias a Rubén polas direccións, e a súa xentiña, a Cris, Natalia, Tamara, Alba, Uxía e Sara e especialmente a Eva por sacar tempo para min. Gracias a Cintia por estar sen estar.

A análise RNA-seq foi posible gracias a Diana Guallar e Miguel Fidalgo, a David e a Alex, proteómica foi gracias a Susana Bravo e accedemos á leite materna gracias a Luz Couce. Gracias á Omar polas correccións e a Mar polo apoio. Gracias ós estudantes que me deixaron aprender a ensinar. Gracias María polos seus servicios non remunerados e a Eva por aprender tanto que agora podo aprender eu dela, moitas gracias á inesperada familia que formamos, a súa acollida e a de Laura, Pablo, Diego, Laila e Migueles fai que me vaia con pena. Gracias por tanta axuda e tantas risas. Gracias a Tamara, Nerea, Saúl e ás de nefro, xente valiosa que agradezo atopar.

Gracias ós que saudei mil veces polo pasillo, gracias ós que che dedican unhas palabras e che deixan cun sorriso curativo, ós que encontran un oco para axudar, ós que non teñen medo de explicar o que saben. Gracias a Ana Torres por axudar tanto cos animais, a Beatriz por desexar un feliz día sempre que che pasa un artigo, e a Alexandra Elbakyan. Gracias ós que intentan xestionar este castelo de naipes, e ós que seguen loitando polos nosos dereitos. Gracias ós que seguides apostando por unha investigación libre e pública.

Agradézolle a Julia por chegar á miña vida e quedarse, é un aire fresco que revolve todo por onde pasa e cae despois ordenado, gracias pola axuda con esta tese. Tamén lle agradezo a Cris todo o que me ensinou. Gracias a Fátima por tanto vivido e a Andrea por deixarme compartir con ela este sinsentido, gracias por axudarme a mantela cordura. Gracias á xente que me espera fóra, e a que me esperou, sen saber a que hora saio. Gracias á Sergio por quererme. Gracias a baile, a teatro e a familia de escalada que tanto me axudan a desconectar. Gracias a Lila, sempre disposta a acompañarme ó monte, e onde vaia.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
Declaración de conflicto de intereses	5
Fuentes de financiación	5
Resumen.....	6
Acrónimos, siglas y abreviaturas	7
INTRODUCCIÓN	10
1 Obesidad	11
1.1 Causas de la obesidad.....	12
1.1.1 Factores modificables.....	12
1.1.2 Factores no modificables.....	13
1.2 Tratamiento de la obesidad	14
1.2.1 Hidrogeles y procedimientos bariátricos endoscópicos.....	14
1.2.2 Cirugía bariátrica.....	15
1.2.3 Terapias farmacológicas.....	15
1.2.4 Terapias en niños y adolescentes.....	16
2 Homeostasis energética.....	16
2.1 Regulación central de la homeostasis energética: hipotálamo.....	17
2.1.1 Núcleo Arcuato (ARC).....	17
2.1.2 Hipotálamo lateral (LHA)	18
2.1.3 Regulación de la ingesta por ayuno y alimentación.....	19
2.2 Regulación de la homeostasis energética a nivel periférico	21
2.2.1 Señales aferentes	21
2.2.2 Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21	21
2.2.3 Metabolismo de lípidos y glucosa	22
2.3 Proteína similar a la angiopoietina 4	23
2.4 Factor tipo Krüppel 15	27
2.5 Proteína nuclear asociada a Btg3.....	29
2.6 Termogénesis del tejido adiposo pardo	30
3 Lactancia materna	31
3.1 Composición de la leche materna.....	32
3.2 Lactancia y obesidad	32
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
1 Animales de experimentación	38
1.1 Anestesia y analgesia	38
1.2 Modelos Animales	39
1.3 Procedimientos experimentales.....	41
1.3.1 Manipulación del estado nutricional.....	41
1.3.2 Resonancia magnética nuclear.....	41
1.3.3 Temperatura interescapular	41
1.3.4 Administración intraperitoneal.....	41
1.3.5 Administración por vena de la cola	42
1.3.6 Administración subcutánea.....	42
1.3.7 Administración intracerebrovascular.....	42
1.3.8 Administración núcleoespecífica.....	43
1.4 Extracción de leche	43
1.5 Eutanasia	43
1.6 Criterios de punto final.....	44

2 Estudio de leche materna.....	44
3 Técnicas analíticas.....	45
3.1 Disección de áreas cerebrales.....	45
3.2 Western Blot.....	45
3.2.1 Extracción proteica.....	45
3.2.2 Preparación de alícuotas de carga.....	46
3.2.3 Electroforesis SDS-PAGE.....	47
3.2.4 Transferencia.....	48
3.2.5 Inmunodetección.....	48
3.2.6 Análisis.....	50
3.3 Secuenciación de ARN.....	50
3.3.1 Extracción de ARN.....	50
3.3.2 Secuenciación y análisis.....	50
3.4 Análisis de ARN mensajero por PCR a tiempo real.....	52
3.4.1 Extracción de ARN.....	52
3.4.2 PCR a tiempo real.....	52
3.5 Determinaciones plasmáticas.....	54
3.6 Proteómica.....	54
3.6.1 Preparación de la muestra.....	54
3.6.2 Preconcentración y digestión.....	55
3.6.3 Cromatografía líquida.....	56
3.6.4 Análisis Cuantitativo (SWATH™).....	56
3.6.5 Análisis bioinformático.....	57
3.7 Análisis estadístico.....	57
4 Referencias comerciales.....	58
RESULTADOS	60
1 La lactancia prolongada modifica la expresión génica hepática	61
1.1 Estudio transcriptómico del modelo de lactancia prolongada	61
1.2 Validación de las dianas metabólicas KLF15, ANGPTL4 y BANP.....	66
2 Reproducción del modelo de lactancia prolongada.....	68
3 ANGPTL4 está regulado por la lactancia prolongada en ratas adultas	70
3.1 ANGPTL4 está presente en leche y sus niveles varían con la lactancia prolongada	70
3.2 ANGPTL4 en hígado y plasma está modificado por la lactancia prolongada en ratas adultas.....	71
4 La regulación de ANGPTL4 en el SNC está mediada por FGF21	73
4.1 FGF21 en SNC provoca un aumento de ANGPTL4 en LHA.....	75
4.2 La inhibición de FGF21 hepático disminuye los niveles de ANGPTL4 en LHA.....	76
5 KLF15 está regulado por la lactancia prolongada desde edades tempranas	79
5.1 KLF15 está presente en leche y sus niveles en humanos varían con la lactancia prolongada	79
5.2 La regulación de KLF15 por la lactancia prolongada depende de la edad	80
6 Análisis proteómico del modelo de lactancia prolongada	82
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	101
Índice de ilustraciones.....	118
Índice de tablas.....	118
Anexos	119

Declaración de conflicto de intereses

La doctoranda, Raquel Pérez Lois, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral titulada:

*IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS METABÓLICAS DE LA LACTANCIA
PROLONGADA*

Fuentes de financiación

La doctoranda, Raquel Pérez Lois, ha realizado esta tesis doctoral con la financiación de una ayuda predoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Resumen

RESUMO

Os factores perinatais son chave no desenvolvemento da obesidade. A lactación materna prolongada protexe contra a obesidade ó aumentar a produción hepática de FGF21, o cal actúa no hipotálamo lateral, activa a termoxénese e reduce o peso corporal. Neste traballo empregamos técnicas de transcriptómica e proteómica para identificar outros mecanismos protectores da lactación contra a obesidade. Entre os factores modificados, seleccionamos e estudamos KLF15 e ANGPTL4, e describimos un novo mecanismo polo cal o FGF21 hepático aumenta os niveis de ANGPTL4 no hipotálamo lateral. Este estudo abre novas liñas de investigación sobre os efectos da lactación prolongada no metabolismo enerxético, e identifica posibles dianas terapéuticas novidosas para o tratamento da obesidade.

RESUMEN

Los factores perinatales son clave en el desarrollo de la obesidad. La lactancia materna prolongada protege contra la obesidad al aumentar la producción hepática de FGF21, el cual actúa en el hipotálamo lateral, activa la termogénesis y reduce el peso corporal. En este trabajo empleamos técnicas de transcriptómica y proteómica para identificar otros mecanismos protectores de la lactancia contra la obesidad. Entre los factores modificados, seleccionamos y estudiamos KLF15 y ANGPTL4, y describimos un nuevo mecanismo por el cual el FGF21 hepático aumenta los niveles de ANGPTL4 en hipotálamo lateral. Este estudio abre nuevas líneas de investigación sobre los efectos de la lactancia prolongada en el metabolismo energético e identifica posibles dianas terapéuticas novedosas para el tratamiento de la obesidad.

ABSTRACT

Perinatal factors are key in the development of obesity. Prolonged breastfeeding protects against obesity by increasing hepatic production of FGF21, which acts in the lateral hypothalamus, activates thermogenesis and reduces body weight. In this work we employed transcriptomic and proteomic techniques to identify other protective mechanisms of lactation against obesity. Among the modified factors, we selected and studied KLF15 and ANGPTL4, and described a new mechanism by which hepatic FGF21 increases ANGPTL4 levels in lateral hypothalamus. This study opens new lines of research on the effects of prolonged lactation on energy metabolism and identifies potential novel therapeutic targets for the treatment of obesity

Acrónimos, siglas y abreviaturas

ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACN	Acetonitrilo
ADCY3	Adenylyl Cyclase 3
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADRB3	Adrenoceptor Beta 3
AGRP	Agouti Related Neuropeptide
AKT	Serine/Threonine Kinase
ALDOA	Aldolase A
ALT	Alanine Aminotransferase
AMPK	Protein Kinase Amp-Activated Catalytic
ANGPTL	Angiopoietin Like
APO	Apolipoprotein
APS	Ammonium persulfate
ARC	Arcuate Nucleus Of The Hypothalamus
ARN	Ácido Ribonucleico
ASIP11	Agouti Signalling Protein
ATP	Adenosine Triphosphate
BANP	BTG3 Associated Nuclear Protein
BAT	Brown Adipose Tissue
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BLH	Banco de Leche Humana
BMAL1	Basic Helix-Loop-Helix Arnt Like 1
CCK	Colecistoquinina
CFD	Complement Factor D
CLOCK	Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput
CNR1	Cannabinoid Receptor 1
CNS	Central Nervous System
CPT	Carnitina Palmitoiltransferasa
DC	Dieta Control
DDA	Data-Dependent Acquisition
DG	Dieta Alta En Grasa
DMH	Dorsomedial Hypothalamic Nucleus
DRD2	Dopamine Receptor D2
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
ENO3	Enolase 3
FASN	Fatty Acid Synthase
FC	Fold Change
FDA	United States Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate
FFA	Free Fatty Acid
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21
FOXO	Forkhead Box O1
FPMK	Fragments Per Kilo base per Million mapped reads
FTO	Fto Alpha-Ketoglutarate Dependent Dioxygenase

G6PC	Glucose-6-Phosphatase Catalytic
GCK	Glucokinase
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GLUT	Glucose Transporter
GO	Gene Ontology
GR	Glucocorticoid Receptor
GTT	Glucose Tolerance Test
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance
HPD	4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HSL	Hormone-Sensitive Lipase
IAA	Iodoacetamida
ICV	Intracerebrovascular
IMC	Índice De Masa Corporal
IP	Intraperitoneal
KLF	Krüppel Like Factor
KSR2	Kinase Suppressor Of Ras 2
LC	Liquid Chromatography
LDHA	Lactate dehydrogenase A
LE	Lactancia Estándar
LEP	Leptin
LEPR	Leptin Receptor
LHA	Lateral Hypothalamic Area
LP	Lactancia Prolongada
LPL	Lipoprotein Lipase
MAF	Transcription Factor Maf
MAFLD	Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease
MARBP	Matrix Attachment Regions Binding Proteins
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
MCH	Melanin-Concentrating Hormone
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRAP2	Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein 2
MS	Mass Spectrometry
mTORC1	Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
NEFAS	Non-Esterified Fatty Acids
NPY	Neuropeptide Y
NTRK2	Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase 2 (Receptor for BDNF)
OMS	Organización Mundial De La Salud
ONECUT1	One Cut Homeobox 1
ORA	Over Representation Analysis
OTC	Ornithine Transcarbamylase
P53	Tumor Protein P53
PCA:	Principal Component Analysis
PK2	Phosphoenolpyruvate Arboxykinase 2, Mitochondrial
PCSK1	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1
PK	Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PEPCK-C	Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
PEPCK-M	Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

PFK	Phosphofructokinase
PFKFB3	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3
PFU	Plaque-Forming Unit
PGC1α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
PHIP	Pleckstrin Homology Domain
PKLR	Pyruvate Kinase, Liver And Blood Cell
POMC	Pro-Opiomelanocortin Neuropeptide
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PRODH	Proline Dehydrogenase 1
PVN	Paraventricular Nucleus Of Hypothalamus
PYY	Peptide YY
SC	Subcutánea
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SH2B1	SH2B Adaptor Protein 1
SIM1	Single-Minded 1 Transcription Factor
SIRT	Sirtuin
SOCS2	Suppressor Of Cytokine Signaling 2
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
UCP1	Uncoupling Protein 1
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund
VLDL	Very-low-density lipoprotein
VMH	Núcleo Hipotalámico Ventromedial
WAT	White Adipose Tissue
WB	Western Blot
XDH	Xanthine Dehydrogenase

INTRODUCCIÓN

1 Obesidad

Aunque la primera persona que utiliza la palabra obesidad en el contexto médico es Tobias Venner en 1660 (1), esta condición lleva afectando a la humanidad desde la prehistoria. La evidencia más antigua de ello es una figura femenina de 35000 años encontrada en Alemania (2) que muestra un cuerpo con facciones femeninas de exagerado tamaño, interpretadas hoy en día como un símbolo de fertilidad. La simbolización del exceso de masa corporal se repite en muchas otras obras prehistóricas, un ritual asociado a la dificultad de nuestros ancestros para conseguir alimento (3).

El culto al exceso de peso se disipa con el tiempo, y en la cultura griega y romana comienza a ser estigmatizada (4). Hipócrates (460-370 a.C.), el actualmente considerado padre de la medicina, lo describe por vez primera como un problema clínico que llevaba a la infertilidad y desórdenes menstruales en las mujeres, e incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares y muerte prematura. Además, también indica certeramente que la restricción dietética y el ejercicio son métodos efectivos para eliminar el exceso de peso. Las epidemias, hambrunas y pobreza del siglo XVII renovaron la obesidad como símbolo de bienestar, salud y belleza, así mismo tras la revolución industrial en el siglo XVIII la mayor cantidad, calidad y variedad de la comida en Europa contribuye a la reducción de la malnutrición y a la promoción de la obesidad, sobre todo entre clases privilegiadas. A finales del siglo XIX y principios del XX se avanzó considerablemente en el estudio de la obesidad, ya considerada un problema de salud público (3), y el revolucionario estudio de calorimetría de Antoine Laurent de Lavoisier (1743–1794) lleva a entender el metabolismo como una forma de combustión (5), un hito que marca un antes y un después en el estudio de la fisiología de la nutrición.

A pesar de avanzar en su conocimiento, los casos de obesidad siguieron aumentando en toda la población hasta nuestros días. Cuando en 1948 se estableció la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya tuvieron en cuenta en su primer reglamento la obesidad como enfermedad y causa de muerte (6). Hoy en día, la OMS define la obesidad como una enfermedad crónica, caracterizada por una acumulación excesiva de grasa y que puede ser perjudicial para la salud. Como método indicador de obesidad se utiliza el Índice de Masa Corporal; un IMC superior a 30 kg/m² se considera obesidad, y superior a 25 kg/m² preobesidad. Para pacientes entre 5 y 19 años el indicador de obesidad es un IMC superior a tres desviaciones estándar por encima de la mediana de Referencia de Crecimiento de la OMS para su edad, y para los menores de 5 años tres desviaciones estándar por encima de la mediana del Patrón de Crecimiento Infantil de la OMS (7).

La obesidad está asociada a diversas enfermedades crónicas, como las cardiovasculares, la diabetes, el cáncer, los trastornos neurológicos, respiratorios y digestivos (8), así como la osteoartritis, la apnea del sueño, y un peor pronóstico ante infecciones, como en el caso de la COVID-19 (9). Estas enfermedades representan una amenaza considerable para la salud pública. Las cardiopatías isquémicas se mantienen como la principal causa de muerte mundial desde 1990, superando a la COVID-19 en 2021, mientras que la diabetes ha pasado del decimocuarto al décimo lugar en ese mismo periodo (10). Se considera la obesidad como el cuarto factor de riesgo más común para el desarrollo de enfermedades no transmisibles, y el mayor factor de riesgo de discapacidad (10).

El estudio epidemiológico de la obesidad muestra que se está incrementando en países de ingresos bajos y medios, cohabitando y superando el bajo peso por malnutrición (11). En Europa, los datos recogidos hasta 2022 hablan de un 60 % de personas adultas afectadas por sobrepeso y obesidad, y en población infantil llega a ser un tercio. Se calcula que el coste total para el sistema sanitario relacionado con el exceso de peso es de 990000 millones de dólares al

año en todo el mundo, más del 13 % del gasto sanitario total. Además, existen predicciones que calculan un gasto de 3 billones de dólares anuales para 2030, que podrían ascender a los 18 billones en 2060 (12).

Las estrategias para luchar contra la obesidad comenzaron en 1984, con el primer informe de la OMS para la prevención de las enfermedades cardiovasculares, poniendo el foco en los niveles de colesterol. A pesar de todos los esfuerzos, en la última Asamblea Mundial de la Salud, en 2022, la obesidad se sigue considerando en aumento y se pronostica que así seguirá durante la siguiente década (13). El mal pronóstico del avance de la obesidad se debe en parte a las predicciones realizadas en la población infantil. Los datos indican que en 1990 el 9 % de la población entre 5 y 19 años tenía sobrepeso, en 2022 este porcentaje asciende al 20 % (7) y se pronostica que aproximadamente 383 millones de niños y adolescentes en todo el mundo tendrán obesidad para el año 2035 (14).

La obesidad infantil conlleva unas consecuencias especialmente alarmantes por sus efectos en el desarrollo y el riesgo de la persistencia hasta la etapa adulta, más del 85% de los jóvenes con obesidad llevarán su exceso de adiposidad a su vida adulta, y el riesgo de que sufran enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 está aumentado (15). Se considera que el periodo perinatal, donde el ser humano aún no cuenta con órganos completamente maduros y funcionales, cuenta con un alto grado de plasticidad, lo que permite una programación o acondicionamiento metabólico acorde al ambiente al que está expuesto, esto es, la alimentación, contaminantes, medicamentos, etc. Este acondicionamiento en una etapa tan sensible podría tener consecuencias hasta después de revertir tales exposiciones, facilitando el desarrollo de enfermedades como la obesidad (16,17).

1.1 Causas de la obesidad

Las causas de la obesidad son múltiples y están interrelacionadas, pero se puede dividir en factores modificables y no modificables. Los factores modificables son aquellos relacionados con el ambiente, y los no modificables con los factores biológicos innatos.

1.1.1 Factores modificables

La actividad física y la composición de la dieta son los dos factores más estrechamente relacionados con la obesidad. Pacientes con obesidad se ven beneficiados hasta de un leve aumento de actividad física. En cuanto a los hábitos alimentarios, hay consenso en que elementos como las cadenas de comida rápida, las bebidas energéticas de gran tamaño y la alta disponibilidad de alimentos ultra procesados baratos son parte del problema, pero no es posible dar con una única composición de dieta saludable (9).

Otros factores menos evidentes que se asocian con la aparición de obesidad son la calidad del sueño, el uso de ciertos medicamentos (antidepresivos, antipsicóticos, antidiabéticos, esteroides y agonistas adrenérgicos), ciertas condiciones médicas (insulinoma, hipotiroidismo, síndrome de Cushing, síndrome del ovario poliquístico o síndrome metabólico), el estado socioeconómico, el estrés, la exposición a químicos disruptores endocrinos o el microbioma intestinal (9).

El ambiente intrauterino se postula como otro factor obesogénico. Factores maternos como el tabaquismo, el aumento de peso y la diabetes gestacional aumentan el riesgo de obesidad en la descendencia. Tras el nacimiento, la baja duración del sueño y el rápido aumento de peso se asocia a mayores riesgos de obesidad. Otro factor que se ha relacionado con esta patología es la duración de la lactancia materna (9) que se detallará en la página 31.

1.1.2 Factores no modificables

Desde que en 1994 apareció en los Jackson Laboratory el primer animal mutante ob/ob, que producía una obesidad espontánea por la disfunción del gen de la leptina (18), se ha aprendido mucho sobre la base genética de la obesidad a través del estudio en modelos animales y el uso de técnicas de secuenciación masiva. Los primeros estudios en familias, gemelos y adopciones han aportado los primeros datos de heredabilidad de la obesidad, ahora estimada entre un 40 y 70 % (19). Hoy en día ya están identificados diferentes mutaciones genéticas (cambios anómalos en la secuencia de ADN), polimorfismos (cambios en la secuencia de ADN, lo que es común entre la población), y cambios en la expresión genética (proceso por el cual la información del ADN se convierte en moléculas funcionales) que parecen tener un papel en la predisposición que un individuo tiene a sufrir obesidad.

La obesidad de origen genética puede ser sindrómica o no sindrómica. La obesidad sindrómica está causada por reordenamientos cromosómicos como el síndrome de Prader-Willi, el de WAGR (tumor Wilms-aniridia), y el de Bardet-Biedl (20). La obesidad no sindrómica se podría dividir por su origen monogénico; si la causa es una sola mutación o deficiencia de un gen, y poligénico; si es la presencia simultánea de muchas variantes genéticas que tienen un efecto acumulativo. La obesidad monogénica afecta a menos del 5 % de los casos (15), es más severa, suele cursar con hiperfagia y comienza en los primeros 5 años de vida. Generalmente, los genes asociados a la obesidad monogénica están implicados en la ruta leptina-melanocortina, algunos de ellos se muestran en la Tabla 1 con sus respectivas proteínas nombradas en inglés (21,22).

Tabla 1: Genes asociados a la obesidad monogénica

Gen	Proteína
LEP	Leptin
LEPR	Leptin receptor
PCSK1	Proprotein convertase subtilisin/kexin enzyme 1
MC4R	Melanocortin-4 receptor
POMC	Pro-opiomelanocortin neuropeptide
ASIP11	Agouti signalling protein
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
SIM1	Single-minded 1 transcription factor
NTRK2/TRKB	Neurotrophic tyrosine receptor kinase 2 (receptor for BDNF)
KSR2	Kinase suppressor of Ras 2 protein
NPY	Neuropeptide Y
SH2B1	SH2B adaptor protein 1
ADCY3	Adenylyl cyclase 3

El descubrimiento de genes asociados a la obesidad poligénica tuvo que esperar a que a finales de los 90 se desarrollasen técnicas genómicas. Primero llegaron los estudios de vinculación genómica (*genome-wide linkage studies*), que se basan en el parentesco de los participantes para comprobar si determinadas regiones cromosómicas están relacionadas con una enfermedad o rasgo a lo largo de las generaciones. Más tarde se desarrollaron estudios de asociación de genoma completo (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*), que tienen un enfoque de generación de hipótesis que examina genomas completos en busca de asociaciones entre variantes genéticas y un fenotipo de interés. Aunque una de las limitaciones de estas técnicas es el uso común del IMC como indicador de obesidad, ya que es una medida que no diferencia masa grasa de muscular (9).

Ciertas modificaciones en los genes expuestos en la Tabla 2 han sido asociadas de forma reproducible con la obesidad poligénica (21), pero existen más de 1100 locus asociados con rasgos de la obesidad. Esta identificación masiva de variantes de riesgo, a diferencia de los estudios sobre genes candidatos, no hacen suposiciones sobre la biología subyacente que vincula las variantes genéticas con la obesidad, si no que se trata de un enfoque imparcial que permite obtener nuevos conocimientos biológicos (9). Tras su identificación, es importante profundizar en el conocimiento biológico y funcional de estos genes para conocer su mecanismo de acción. Un análisis genético de 339224 individuos pudo identificar 97 locus asociados con la obesidad, la mayoría cercanos a genes con una alta expresión en el sistema nervioso central (SNC), (23), lo que lo convierte en un sistema clave para su tratamiento.

Tabla 2: Genes asociados a la obesidad poligénica

Gen	Proteína
ADRB3	Adrenoceptor Beta 3
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CNR1	Cannabinoid Receptor 1
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
PCSK1	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1
PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
FTO	FTO Alpha-Ketoglutarate Dependent Dioxygenase
MAF	Transcription Factor Maf

1.2 Tratamiento de la obesidad

Es imperativo comenzar mencionando la prevención como el mejor método para reducir los niveles de obesidad en la población, aunque de por sí no se trate de un tratamiento. En las últimas tres décadas la obesidad hace aparición en edades cada vez más tempranas (11) y habiéndose comprobado que la pérdida de peso y su mantenimiento es difícil de conseguir, la ganancia de peso en la infancia o adolescencia conlleva un alto riesgo de sobrepeso u obesidad en la edad adulta, más riesgo y aparición más temprana de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (13).

Una vez que la obesidad afecta a un paciente, su carácter crónico demanda un tratamiento con un enfoque a largo plazo y multimodal, combinando intervenciones en el estilo de vida, medicación y cirugías. Sea cual sea el tratamiento elegido para un paciente con obesidad, los hábitos dietéticos y físicos son fundamentales. Llegan a suponer entre un 7 y 10 % de pérdida de peso en ensayos clínicos de 52 semanas de duración (24).

1.2.1 Hidrogeles y procedimientos bariátricos endoscópicos

Existen técnicas poco invasivas para generar pérdida de peso al reducir la capacidad gástrica y así generar saciedad. Los hidrogeles orales aumentan de volumen en el estómago al absorber agua, consiguen una media del 6.4 % de pérdida de peso a las 24 semanas, el 27 % de los pacientes alcanzaron un 10 % de pérdida de peso. El balón intragástrico es inflado con aire o fluidos durante 6-12 meses, aunque su efectividad es controvertida (24). Una tercera opción es la gastroplastia endoscópica, donde se pliega la curvatura mayor del estómago con suturas. Solo existe un estudio que indica una pérdida del 13.6% del peso a las 52 semanas, pero con 1 % de los pacientes presentando complicaciones (24).

1.2.2 Cirugía bariátrica

La cirugía bariátrica está indicada para pacientes con un IMC mayor de 40 Kg/m², o de 35 Kg/m² que presentan comorbilidades como diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hipertensión o síndrome de apnea del sueño, en los que el tratamiento dietético y de estilo de vida hayan fracasado, estén motivados, bien informados y libres de enfermedades psicológicas significativas (25). La mejora de la diabetes tras esta cirugía es extraordinaria, su remisión sucede entre el 33 y 90 % de los pacientes, frente al 0-39 % con solo manejo médico (26). Además, también mejoran los resultados cardiovasculares y se reduce la mortalidad tanto cardiovascular como general (27).

Los procedimientos más realizados son la gastrectomía en manga y el bypass gástrico en Y de Roux. La gastrectomía elimina el 75-85 % del estómago a lo largo de la curvatura mayor, y el bypass además de reducir el tamaño del estómago, lo conecta a un extremo distal del intestino delgado, generando así malabsorción. A corto plazo, la pérdida de peso es similar entre ambas técnicas (aproximadamente 30 % del peso corporal total a los 12 meses). En un seguimiento de 5 a 7 años el bypass gástrico en Y de Roux mostró mayor pérdida de peso (27 % frente al 23 % del peso corporal total).

Las complicaciones asociadas a este tratamiento han sufrido una disminución en los últimos 20 años gracias a la mejora de los protocolos de atención al paciente y al enfoque laparoscópico, con tasas de mortalidad dentro de los 30 días posteriores al procedimiento quirúrgico que oscilan entre el 0,03 % y el 0,20 %. Sin embargo, ha aumentado la ocurrencia de cirugías de revisión a nivel mundial para paliar la recuperación de peso, la pérdida de peso insuficiente y el control de complicaciones metabólicas. Queda por establecer si la adición de medicamentos antiobesidad podría reducir la necesidad de algunas cirugías de revisión (24).

1.2.3 Terapias farmacológicas

Los medicamentos contra la obesidad generados en los últimos años han supuesto una revolución para su tratamiento, sin embargo, su uso no ha supuesto más que entre un 1 y un 3 % de los pacientes elegibles en Europa y Estados Unidos. Las causas de este bajo uso podrían ser su alto coste; a veces no cubierto por la seguridad social o los seguros privados, o los efectos secundarios asociados (28,29).

Actualmente, los medicamentos que están aprobados por la Comisión Europea para el tratamiento de la obesidad son Xenical (orlistat), Omnitrope (somatropina), Alli (orlistat), Mysimba (naltrexona-bupropión), Saxenda (liraglutida), Imcivree (setmelanotida), Mounjaro (tirzepatida) y Wegovy (semaglutida). Mysimba está bajo revisión por incertidumbres sobre sus efectos a largo plazo en el sistema cardiovascular (30).

Exceptuando el orlistat, que inactiva la lipasa gástrica y pancreática provocando la excreción de la grasa ingerida, el resto de los medicamentos actúan principalmente a nivel del sistema nervioso central. Los efectos perseguidos son la regulación de la ingesta a través de la reducción del apetito, la promoción de la saciedad, la reducción de la recompensa provocada por la alimentación o su combinación (24). La efectividad de estos tratamientos está en constante estudio y se enfrenta a la dificultad que presenta la variación interindividual. Aunque la cirugía bariátrica aún no se ha comparado con los nuevos medicamentos antiobesidad altamente efectivos, logra una mayor pérdida de peso en comparación con la terapia farmacológica más antigua (15). Los ensayos clínicos concluyen que a los 12 meses el orlistat consigue un 4 % de pérdida de peso más que el placebo, la naltrexona y bupropión, y la liraglutida un 5 y 6 %, y la semaglutida un 12,5 % (24). Excepto en este último caso, se trata de una efectividad aún modesta, pero es esperable que la combinación de estas moléculas y la aparición de nuevos medicamentos, consigan una potencia mucho mayor y cambien el manejo

médico del control del peso en un futuro no muy lejano (28). Existen de hecho otros medicamentos con mayor efectividad en ensayos preclínicos, como la tirzepatide, un agonista dual de las hormonas gástricas péptido similar a glucagón 1 (GLP1) y el polipéptido inhibidor gástrico (GIP), que muestra una reducción del 22,5 % del peso corporal tras 72 semanas de tratamiento, o triagonistas como HM15211 o LY3437943, que además de activar los receptores de GLP1 y GIP, también activan al del glucagón (31–33).

1.2.4 Terapias en niños y adolescentes

El tratamiento de la obesidad desde la edad infantil es muy importante para reducir los niveles de esta enfermedad en el futuro. Teniendo en cuenta que los niños y adolescentes resultan incluso más vulnerables que los adultos a las presiones socioeconómicas y al ambiente obesogénico, la prevención y tratamiento tempranos en estos casos son cruciales.

El uso de cirugías bariátricas está restringido para adolescentes que han alcanzado cierta madurez física y presentan formas severas de obesidad acompañadas de comorbilidades. En cuanto a la farmacoterapia, existen tratamientos para la obesidad sindrómica y monogénica en niños, pero hay poca información sobre la seguridad de los tratamientos contra la obesidad no poligénica. El único tratamiento farmacológico aceptado es la Saxenda, o la liraglutida, aprobado por la FDA (*United States Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) para niños mayores de 12 años (30,34).

Esta falta de medios para combatir la obesidad en edades juveniles pone el foco en la importancia de prevenir su aparición, modulando el ambiente en el que las nuevas generaciones se desarrollan, incluso antes de su concepción.

2 Homeostasis energética

El desarrollo de la obesidad se explica por un desequilibrio de la homeostasis energética, es decir, cuando no existe un balance entre la ingesta, y el gasto energético. La ingesta energética en el organismo humano se produce únicamente mediante la dieta, y el gasto se divide entre el metabolismo basal (procesos básicos del organismo para mantenerse en funcionamiento en estado de reposo), la actividad física y la termogénesis (la capacidad del organismo de generar calor). La exposición de un organismo a una ingesta energética mayor que su gasto energético de forma crónica podría dar lugar a la acumulación de la energía en forma de grasa y al desarrollo de obesidad.

Este modelo homeostático es una simplificación de la regulación del almacenamiento de la energía. El término homeostasis hace referencia a la capacidad de un organismo de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno. Aplicado a la energía, esto significaría que, si las necesidades energéticas están cubiertas, la ingesta debería disminuir o el gasto energético aumentar. Ciertamente existe una tendencia al mantenimiento de un peso corporal constante por parte de la población, sin embargo, los datos de obesidad se podrían interpretar como el fracaso de los mecanismos de la homeostasis energética, o bien como una simplificación excesiva del modelo. Se sabe, por ejemplo, que la composición de macronutrientes de la dieta, el momento y tamaño de la ingesta, la actividad física y la capacidad de oxidación del individuo son factores que interfieren en la homeostasis energética, y que vuelven más complejo el modelo (35).

En este entorno, la comunidad científica comienza a testar distintos modelos que puedan explicar la regulación de la energía disponible de un organismo, como la homeorhesis o la alostasis. Mientras que el término homeostasis hace referencia a la estabilidad alrededor de una situación estática, como la temperatura corporal, o el pH, la homeorhesis se refiere a la estabilidad alrededor de una trayectoria o un cambio continuo: crecimiento, embarazo,

adaptaciones al estrés, o al ejercicio físico. Un modelo como este explicaría la dificultad de volver a un peso saludable cuando el organismo está aclimatado a un peso superior (35). Por su parte, alostasis incorpora al concepto de homeostasis la capacidad que tiene el organismo de generar cambios de forma anticipada, sin requerir así la desviación de un parámetro regulado para que ocurra la contrarregulación (36). Un ejemplo de alostasis son los cambios fisiológicos que se producen tras la exposición continuada a factores estresantes.

Sea cual sea el modelo de ajuste, son bien conocidos ciertos reguladores que controlan el gasto y el ingreso energético en un organismo. El estudio de estos mecanismos de regulación metabólica es importante para conocer como sus alteraciones conducen al desarrollo de la obesidad y sus desórdenes metabólicos (36). Los componentes básicos de este sistema son las señales aferentes humorales y neurales que llegan al sistema nervioso central, los circuitos neurales que detectan y responden a esos estímulos, y los ajustes adaptativos resultantes de comportamiento alimentario y metabolismo energético que pretenden mantener estables las reservas de grasa y carbohidratos (37).

2.1 Regulación central de la homeostasis energética: hipotálamo

El sistema nervioso central (SNC) es considerado el centro integrador de las señales periféricas del estado energético y el modulador de la ingesta y del gasto energético. De hecho, las vías neuronales que controlan los aspectos hedónicos de la ingesta alimentaria están manifestándose como los mayores conductores del peso corporal tanto para la obesidad monogénica como poligénica (9). En la Ilustración 1 se resumen algunos de los mecanismos que utiliza el SNC para la regulación de la homeostasis energética, los cuales detallaremos a continuación.

El hipotálamo es una de las regiones del SNC más estudiadas e importantes para el balance energético. Se trata de una parte del diencefalo que se ocupa principalmente del control de las funciones autónomas y endocrinas que sirven para mantener la homeostasis corporal (la circulación, la digestión, el control de la temperatura, etc.). La división clásica del hipotálamo en áreas diferenciadas por sus funciones se debe a experimentos de lesiones, y estos núcleos hipotalámicos sirven hoy de referencia anatómica, pero su interconexión neuronal es imprescindible para el desarrollo de sus funciones. Aunque bien es cierto que las distintas regiones del hipotálamo están compuestas por grupos neuronales que expresan ciertos neurotransmisores específicos (38).

En el hipotálamo podemos distinguir cinco núcleos diferenciados por sus funciones e interconectados entre sí. Estos son en el núcleo arcuato hipotalámico (ARC), el núcleo ventromedial (VMH), el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH). A continuación, se detallarán algunos de los más importantes.

2.1.1 Núcleo Arcuato (ARC)

El núcleo arcuato juega un papel importante para el balance energético por dos razones principales; contener las dos poblaciones neuronales más importantes de la vía de melanocortina, y situarse en una localización ventajosa para detectar fácilmente señales hormonales y nutrientes circulantes, como la leptina, la glucosa, la insulina, etc. (39,40). Su posición, en la parte ventral del hipotálamo y cerca de la eminencia media, le da acceso a una barrera hematoencefálica mucho más porosa y a células de la glía especializadas en el transporte activo de sustancias del torrente sanguíneo hacia el SNC; los tanicitos. Estas células recubren el tercer ventrículo y contactan los vasos sanguíneos de la eminencia media con las neuronas cercanas del hipotálamo mediobasal (formado por VMH y ARC). Se ha descrito ya el transporte

de GLP1 e insulina del torrente sanguíneo hacia el ARC por medio de los tanicitos (40), además del transporte de FGF21 dependiente de su receptor, necesario para que la proteína genere su efecto de activación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT) (41).

Las neuronas mencionadas anteriormente que conforman el grueso del sistema de melanocortina desarrollan papeles antagónicos en la regulación del balance energético. Las que expresan neuropéptido Y y el péptido similar a agoutí (NPY/AgRP) tienen función orexigénica y disminuyen la actividad metabólica del BAT, son activadas en condiciones de deficiencia energética e inhibidas por la leptina y la insulina (40). Las neuronas que expresan proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) son anorexigénicas e incrementan el metabolismo del BAT (35,39), se activan en estados de balance energético positivo (40). La POMC es procesada postraduccionalmente para producir diferentes moléculas bioactivas, entre ellas la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH) y β (β -MSH) que han demostrado ser claves para la regulación del apetito, gasto energético y peso corporal a través del receptor de melanocortina acoplado a proteína G4 (MC4R) (22).

La actividad de estas neuronas está mediada por señales aferentes, como la leptina, cuyos receptores están presentes tanto en las neuronas POMC como AgRP. La importancia de esta vía para la regulación energética se pone en evidencia al encontrar que la vasta mayoría de los genes asociados a la obesidad en humanos desarrollan algún papel en esta vía (LEPR, POMC, AGRP, MCR4R, PCSK1, SH2B1, PHIP, MRAP2 y SIM1) (9).

El ARC envía proyecciones neuronales a otros núcleos hipotalámicos; al PVN, al DMH, al LHA y al VMH. Este último núcleo tiene especial importancia en la homeostasis energética; es considerado el centro de saciedad, su estimulación inhibe la ingesta y las lesiones en esta región causan sobrealimentación y ganancia de peso. Existe una alta abundancia de los receptores de leptina en las neuronas del VMH (37). Las neuronas de segundo orden de estos núcleos procesan la información recibida y a su vez proyectan a otros circuitos fuera del hipotálamo.

2.1.2 Hipotálamo lateral (LHA)

Se trata de una región vagamente definida posterior al área preóptica y anterior al área ventral tegmental. El LHA se conoce como el centro de ingesta por controlar el comportamiento alimentario. Su estimulación incrementa la ingesta y su destrucción o lesión la atenúa (42).

Dos de las poblaciones neuronales más abundantes de este núcleo están definidas por la expresión y liberación de dos neurotransmisores muy comunes del SNC, uno inhibitorio; el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y otro excitatorio; el glutamato. La población con función inhibitoria, las neuronas GABAérgicas, están definidas normalmente por la expresión del transportador vesicular de GABA (Vgat). A la población glutamatérgica la define la expresión del transportador vesicular de glutamato tipo 2 (Vglut2). Estas neuronas Vgat y Vglut2 del LHA están divididas en subgrupos que expresan diferentes marcadores moleculares, ambos grupos juegan papeles opuestos en el comportamiento guiado por motivaciones y el balance energético (43).

Las neuronas GABAérgicas promueven la búsqueda de alimento, y comportamientos motivados, ambos necesarios para generar un balance energético positivo, tanto de forma aguda como a largo plazo. De forma opuesta, las neuronas glutamatérgicas inhiben la búsqueda de alimento y el consumo, y la magnitud de la respuesta a su activación depende de las necesidades energéticas existentes; parecen menos activas en ayuno y más activas poco después de iniciar el consumo de alimentos. Todo ello lleva a pensar que las neuronas Vglut2 del LHA transmiten una señal de detención de la alimentación en curso (43).

Otra población importante de neuronas en el LHA son las que expresan orexina, también conocida como hipocretina. Estas neuronas son glutamatérgicas, expresan Vglut2 (42) y su

presencia está casi restringida al LHA. Se cree que las neuronas de orexina promueven la vigilia, los comportamientos motivados, la locomoción, la búsqueda de alimento, la ingesta, el gasto energético y los niveles de glucosa. A pesar de aumentar la ingesta, sus efectos sobre la actividad locomotora relacionan los efectos de la orexina con el fenotipo delgado (43). También es importante mencionar las neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH), otro grupo de neuronas Vglut2 que coexpresan un marcador GABAérgico, *Gad1*, lo que sugiere la existencia de subgrupos inhibitorios y excitatorios. En contraposición a las neuronas orexigénicas, las neuronas MCH favorecen el reposo, la acumulación de grasa y la hiperfagia (42). Estas neuronas son activadas por la glucosa, la insulina y las señales predictoras de la ingesta y su actividad incrementa a lo largo de la comida para amplificar el consumo (43,44).

Ilustración 1: Resumen de los mecanismos del balance energético.

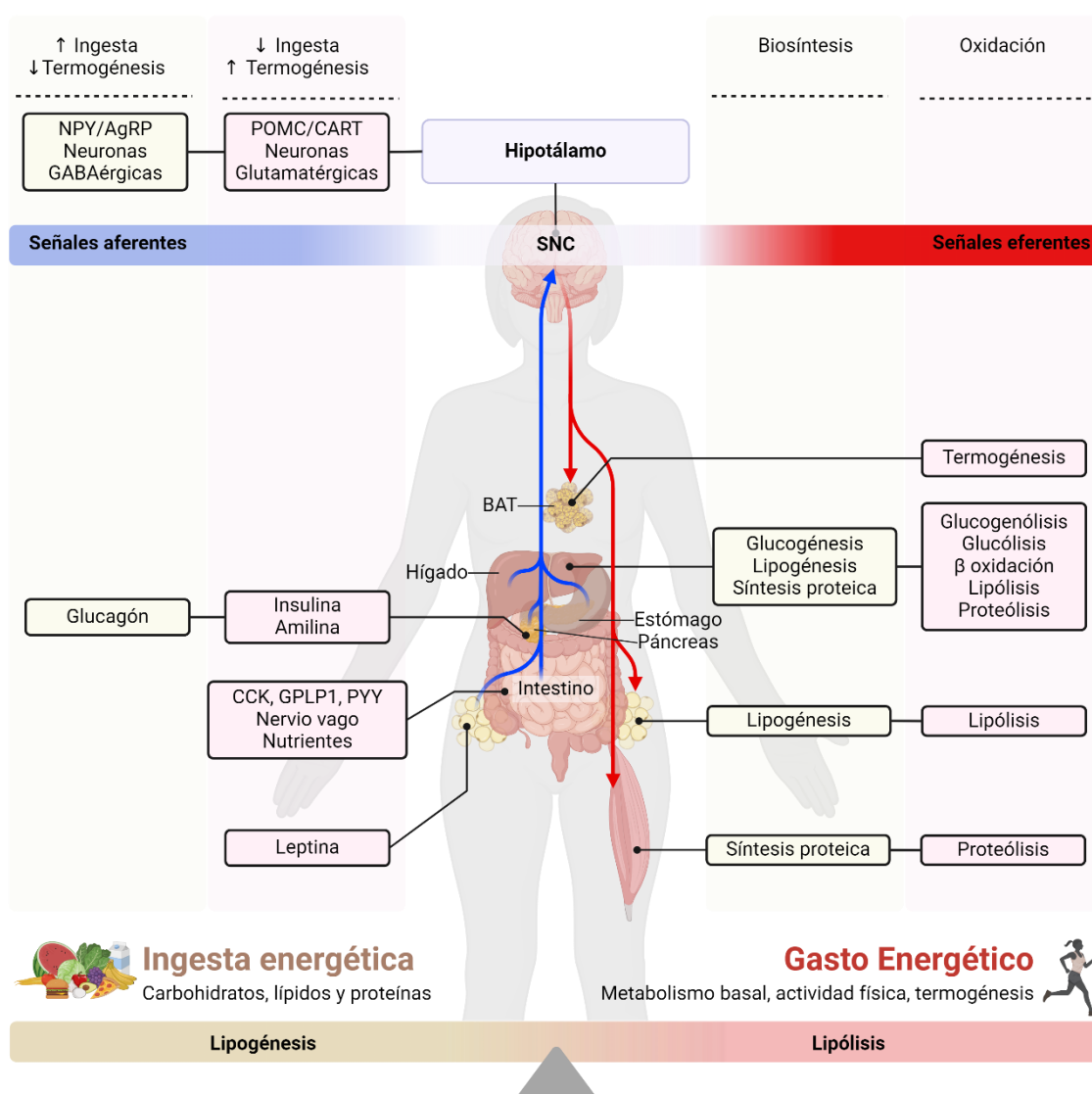


Imagen de elaboración propia en Biorender.

2.1.3 Regulación de la ingesta por ayuno y alimentación

La ingesta de nutrientes y el ayuno regulan la sensación de hambre y saciedad y el gasto energético mediante diferentes acciones en el hipotálamo (Ilustración 2). Tras la ingesta de

alimentos, la α -MSH, es liberada por axones de neuronas POMC/CART y activa los receptores de melanocortina MC4R en neuronas del PVN, disminuyendo la ingesta de alimentos y aumentando el gasto energético.

Durante el ayuno se activa el sistema de promoción del apetito. Las neuronas AgRP/NPY que proyectan al PVN y LHA se activan, liberando NPY y AgRP. El NPY estimula de forma rápida la ingesta de alimentos mediante los receptores Y1, Y2 y Y5, y reduce el gasto energético al disminuir la expresión de tirosina hidroxilasa en el PVN y el tronco cerebral, reduciendo la actividad del BAT. AgRP, actuando como antagonista de MC4R, previene el efecto anorexigénico del α -MSH en las neuronas de segundo orden. Las neuronas AgRP/NPY inhiben además las neuronas POMC directamente a través de la acción inhibitoria de GABA en el ARC (39).

En un paciente con obesidad, la respuesta a la ingesta de alimentos está deteriorada. Existe una resistencia a la leptina y a la insulina, tanto a nivel periférico como central (45), debido en parte al estado de inflamación del SNC (39). La obesidad también afecta a la función mitocondrial, los niveles de especies reactivas del oxígeno, que funcionan como moléculas indicadoras del estado energético de las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART, se estabilizan tras una dieta alta en grasa dificultado la señalización de la saciedad en las neuronas POMC (46).

Ilustración 2: Circuitos hipotalámicos reguladores del apetito y el gasto energético

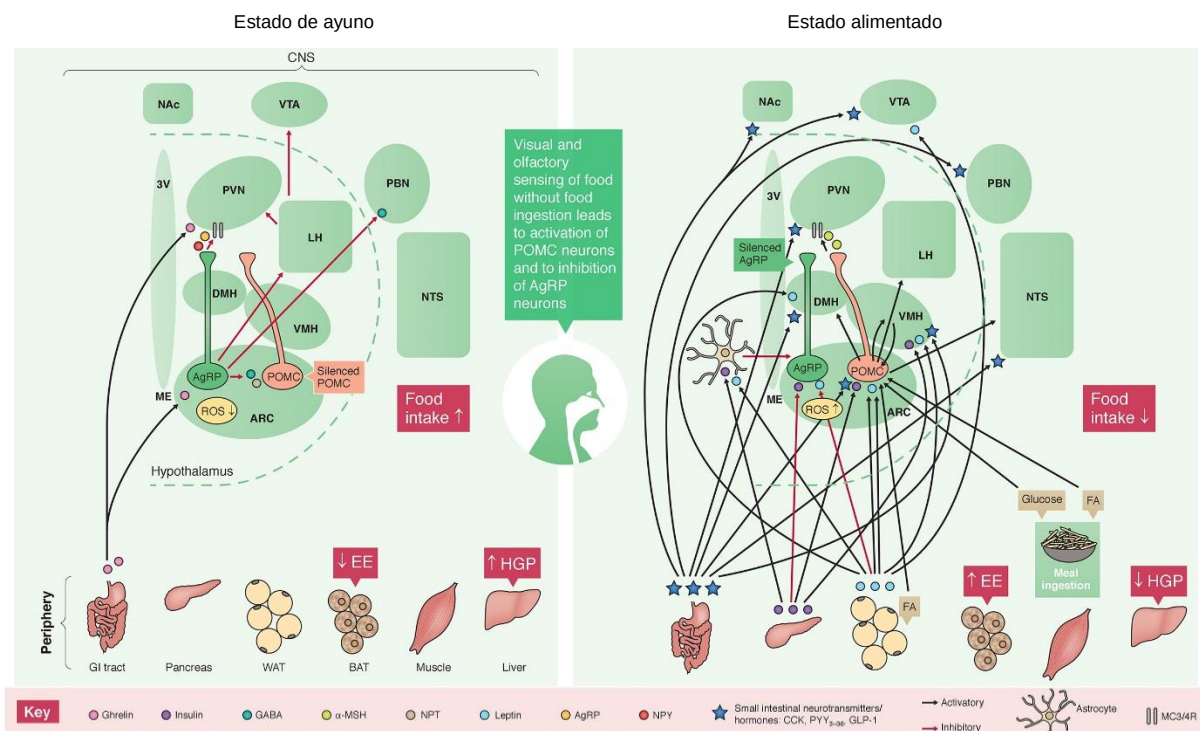


Imagen tomada de Timper K, Brüning JC, *Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity*, *Dis Model Mech.* 2017 Jun 1;10(6):679-689. Bajo la licencia Creative Commons Attribution 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>). (39)

2.2 Regulación de la homeostasis energética a nivel periférico

2.2.1 Señales aferentes

El primer elemento que se ve modificado ante cualquier cambio que afecta a la regulación energética es el conjunto de hormonas, factores nutricionales y redes neuronales que conectan órganos metabólicamente activos periféricos con el SNC.

Una de las hormonas reguladoras del balance energético más estudiadas es la leptina, una adipocina que indica, a través de su receptor LEPR situado en núcleos del hipotálamo como el ARC, LHA y VMH, el estado de las reservas de triglicéridos, ya que sus niveles son proporcionales a la masa grasa del individuo (47). Su función es la de la regulación a largo plazo del peso corporal, al inhibir la ingesta e incrementar el gasto energético (37). La insulina y la amilina, secretadas por el páncreas, y las hormonas gastrointestinales colecistoquinina (CCK), péptido similar a glucagón 1 (GLP1) y péptido YY (PYY) son ejemplos de señales secretadas en respuesta a la ingesta. Además, el estómago también informa al SNC, específicamente al núcleo del tracto solitario (38), de la distensión causada por la ingesta a través del nervio vago. De esta manera se regula la respuesta rápida a una comida y se promueve su finalización en un corto período de tiempo (48).

El glucagón, secretado por las células pancreáticas α , tiene funciones opuestas a la insulina. Es secretado en respuesta a la hipoglucemia e incrementa la glucosa circulante (49). Otra hormona que responde al ayuno es la ghrelina, secretada por el estómago y que tiene una función orexigénica a corto plazo, promueve el apetito en anticipación a las comidas (37).

A pesar de no ser una hormona ni una neurona, la glucosa también se debe considerar como una señal aferente del estado energético del cuerpo. Existen neuronas sensibles a la glucosa en el hipotálamo que responden a sus niveles generando hambre cuando son bajos y saciedad cuando son altos (38).

Por su importancia en este trabajo, en el siguiente apartado hablaremos del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21 (FGF21) como señal aferente con efectos en el SNC y en la homeostasis energética.

2.2.2 Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21

FGF21 es una hormona peptídica sintetizada principalmente en el hígado (50–52), es inducida en respuesta a señales nutricionales, como la presencia de ácidos grasos endógenos o dietéticos, y es secretada al torrente sanguíneo. También existe expresión de FGF21 en el WAT, BAT y páncreas donde actúa de manera paracrina y autocrina, no afectando significativamente a sus niveles circulantes (53). Algunas de las funciones metabólicas asociadas a FGF21 son la disminución de los niveles de glucosa, la mejora de la sensibilidad a la insulina, la promoción de la gluconeogénesis, ketogénesis y oxidación de ácidos grasos y el aumento de la termogénesis y del pardeamiento del WAT (53,54).

Los niveles circulantes de FGF21 son muy bajos en la etapa fetal, y aumentan drásticamente tras el nacimiento y el inicio de la lactancia contribuyendo a la homeostasis térmica del neonato al inducir la termogénesis del BAT (54). Se conoce que, en animales adultos, FGF21 circulante alcanza el SNC (53) y aumenta la termogénesis del BAT y el pardeamiento del WAT por estimulación β -adrenérgica (55,56) y dopaminérgica (41). Otras funciones que FGF21 realiza por su actuación en el SNC es la disminución de la preferencia por lo dulce (57) y el incremento de glucocorticoides, que induce la gluconeogénesis hepática (54).

En la obesidad, los niveles de FGF21 están elevados y existe una resistencia a sus funciones debido a la menor expresión de su receptor (54), aunque esta resistencia no está del todo clara,

ya que existen múltiples estudios donde la administración de FGF21 en animales con obesidad o diabetes tipo 2 tiene efectos beneficiosos (58). Por ello han existido diversos intentos para probar su uso terapéutico en humanos. Los análogos de FGF21 parecen ser efectivos para el tratamiento de la MAFLD y la esteatohepatitis, aunque no los niveles de glucosa (53). A la espera de mayores estudios que analicen posibles efectos adversos de estos tratamientos, los análogos de FGF21 podrían convertirse en una estrategia para tratar las enfermedades asociadas a la obesidad combinado con fármacos antidiabéticos (58).

2.2.3 Metabolismo de lípidos y glucosa

Las señales aferentes llevan información al SNC y a tejidos metabólicamente activos para gestionar los sustratos energéticos de una manera óptima según las condiciones ambientales y las necesidades metabólicas. Las tres formas de las que los humanos pueden obtener energía son las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos, y mediante procesos anabólicos y catabólicos estas sustancias se pueden sintetizar para almacenar energía o degradar para obtenerla.

El balance energético se sustenta en la correcta partición entre la biosíntesis y la oxidación de glucosa y lípidos, y el hígado es su mayor regulador durante los períodos de ayuno y alimentación. En el hígado postprandial, la glucosa se almacena como glucógeno, ácidos grasos o aminoácidos, los ácidos grasos se esterifican y, o bien se almacenan, o salen a circulación dentro de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y los aminoácidos se sintetizan para generar proteínas u otras moléculas bioactivas (59).

En estado de depleción energética, ayuno o ejercicio, los sustratos energéticos se secretan del hígado a la circulación para aportar energía a los tejidos. Además, en el tejido adiposo se produce lipólisis, y se liberan ácidos grasos no esterificados (NEFAS) y glicerol, en el músculo se produce glucogenólisis, liberando glucosa, y proteólisis liberando alanina y lactato. El glicerol, la alanina y el lactato sirven en el hígado para la gluconeogénesis. La oxidación de los NEFAS se produce en el hígado mediante la β oxidación y la cetogénesis (59).

Este equilibrio está regulado por la disponibilidad de nutrientes, hormonas y señales neuronales. La insulina aumenta tras la ingesta para estimular la glucólisis, la lipogénesis y la glucogénesis, y suprime la gluconeogénesis, mientras que el glucagón contrarresta sus funciones en el ayuno (60). Existen muchos otros factores con papeles importantes en esta regulación. El receptor de glucosa GLUT2 permite que, tras la alimentación, la glucosa entre a los hepatocitos para la glucogénesis. La gluconeogénesis por su parte está estimulada por FOXO1, PEPCK-C o PGC1 α , y la glucólisis está regulada especialmente por cuatro quinasas; GSK, PFK, PKLR y PDKs (61).

En cuanto a la regulación lipídica, la enzima LPL es el principal factor limitante de la lipólisis, coactivada por APOA4, APOA5 y APOC2 y suprimida por APOC3 (62,63), promueve la eliminación de triglicéridos de alta densidad y quilomicrones de la circulación. La β -oxidación de los ácidos grasos liberados por la lipólisis necesita de CPT1 y está favorecida por PPAR α , PGC1 α , SIRT1 y SIRT6 e inhibida por mTORC1, AKT, FGF21 y glucagón. La lipogénesis por su parte necesita del funcionamiento de enzimas como ACC, FASN, PPAR γ y SREBP-1b (61).

Por los resultados de la presente tesis es importante introducir a tres proteínas cuyas funciones, aún no completamente aclaradas, están relacionadas con el metabolismo energético, ANGPTL4, KLF15 y BANP.

2.3 Proteína similar a la angiopoyetina 4

La ANGPTL4, denominada también como el factor adiposo inducido por el ayuno (FIAF), la proteína relacionada con la angiopoyetina/fibrinógeno hepático (HFARP) o la angiopoyetina relacionada con PPAR γ (PGAR), forma parte de una familia de 8 proteínas estructuralmente similares a las angiopoyetinas (ANGPTs). Estas proteínas están involucradas en varias funciones importantes del cuerpo, como la regulación del metabolismo de grasas y azúcar, la expansión de células madre en la sangre, la inflamación crónica, la formación de nuevos vasos sanguíneos y el control de su permeabilidad (64).

ANGPTL4 fue descubierta en el año 2000 mediante tres cribados distintos y simultáneos: un análisis de nuevas dianas de PPAR γ , un análisis de factores inducidos por el ayuno en el hígado y un análisis genético para identificar nuevas proteínas relacionadas con las angiopoyetinas (65–67). Los tejidos con más expresión de ANGPTL4 son el hígado y el tejido adiposo, tanto en humanos (52), como en ratones (65,66), y se ha encontrado que todos los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) aumentan esta expresión (67,68) mediante unión directa con su promotor, tanto en humanos como en ratones y ratas (68). Otros reguladores que aumentan la expresión de ANGPTL4 son el frío, el ayuno y la hipoxia (66).

ANGPTL4 es una proteína multifuncional, que regula procesos metabólicos y no metabólicos a través de sus distintos dominios terminales. Como todas las proteínas de su familia, ANGPTL4 contiene dominios de hélice enrollada en la porción N-terminal y dominios similares al fibrinógeno en la porción C-terminal (65). Estos dominios están relacionados con funciones biológicas distintas; el dominio C-terminal (35 kDa) media en las funciones antiangiogénicas de ANGPTL4 (69), y el dominio N-terminal (15 kDa) tiene efectos inhibitorios sobre la lipoproteína lipasa (LPL) (70). La proteína completa monomérica pesa 50 kDa, y el dominio N-terminal puede formar oligómeros mediante puentes disulfuro, y parece que esta estructura tiene mayor efecto en la inhibición de LPL (71). En estado de oligómero, la región que conecta ambos dominios puede ser cortada por convertasas de proproteínas, liberando el N-terminal en forma de dímeros o tetrámeros, y dos monómeros correspondientes al C-terminal (72,73). El proceso de oligomerización tiene lugar intracelularmente, y parece facilitar su secreción y acumulación extracelular y su estabilidad in vivo (Ilustración 3). La escisión de ANGPTL4 se produce extracelularmente, mejora sus niveles de aclaramiento de la circulación y no es necesaria para la inhibición de LPL (73).

Ilustración 3: Inhibición de LPL por ANGPTL4

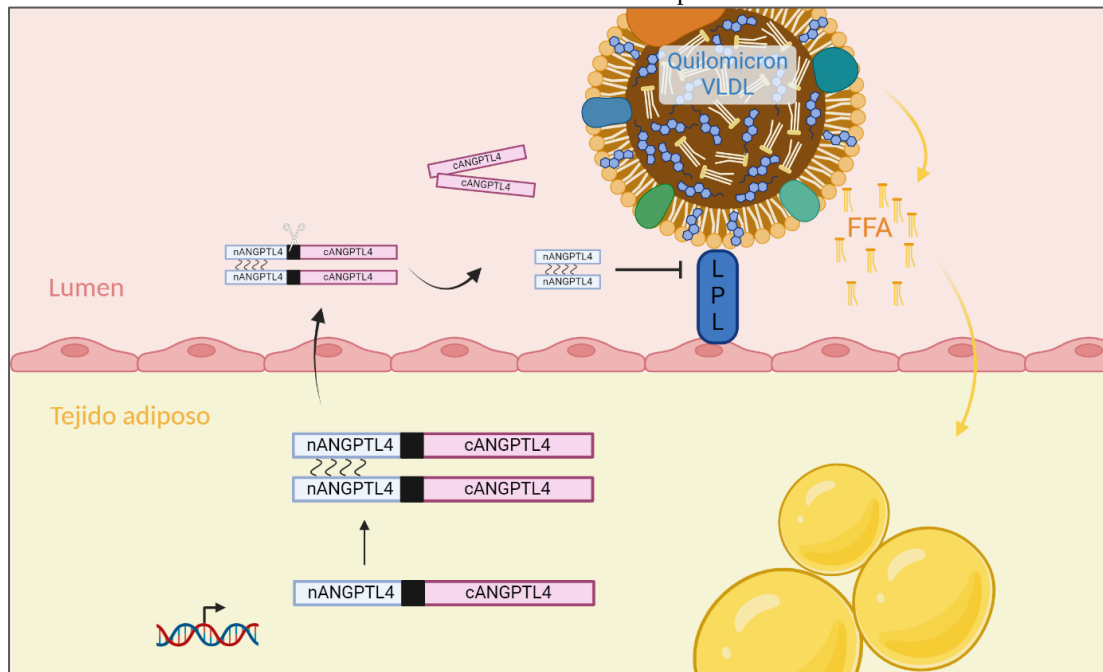


Imagen de elaboración propia en Biorender.

2.3.1.1 ANGPTL4 en el metabolismo lipídico

Los ácidos grasos sirven de combustible para ciertos tipos celulares, y de sustrato para el almacenamiento de energía para el WAT. En el sistema circulatorio los ácidos grasos se transportan en forma de triglicéridos, dentro de las partículas de colesterol. En el hígado, los ácidos grasos provenientes de la dieta se ensamblan dentro de los quilomicrones, y los provenientes de la propia síntesis hepática van dentro de VLDL. Ambas partículas son lipoproteínas ricas en triglicéridos. La hidrólisis de estos triglicéridos para liberar sus ácidos grasos y que puedan ser utilizados por los tejidos corre a cargo de la LPL (74).

LPL es una enzima expresada en muchos tejidos como el adiposo, el músculo cardíaco, el esquelético, el pulmón, la glándula mamaria o el cerebro. Tras su síntesis es secretada y transportada a la capa luminal de las células endoteliales vasculares, donde se queda anclada. De esta forma, LPL se convierte en el mayor regulador del metabolismo lipídico, controlando los niveles de triglicéridos en circulación al distribuirlos distintamente por los tejidos periféricos (75).

Al tratarse de una pieza clave para la distribución de los triglicéridos, la actividad de LPL está regulada transcripcional, traslacional y postraslacionalmente para derivar los triglicéridos a aquellos órganos que más se beneficiarían teniendo en cuenta el estado energético. En condiciones postprandiales la actividad de LPL está aumentada en el tejido adiposo e inhibida en el músculo esquelético y corazón, para favorecer el acúmulo de grasa. En condiciones de ayuno sucede lo contrario, LPL permite la entrada de triglicéridos en músculo y corazón que servirán como combustible (75).

Las proteínas ANGPTL3, 4 y 8 han ganado importancia como moduladores postraslacionales de LPL (76). ANGPTL3 y 8 son secretadas por el hígado, y la función principal de ANGPTL8 es activar a ANGPTL3, cuya estructura y función es muy parecida a ANGPTL4 (74). Durante el ayuno, la expresión de ANGPTL4 en tejido adiposo aumenta en cuestión de horas (66,77) para evitar que los ácidos grasos procedentes de lipogénesis de novo y de la dieta sean almacenados en los adipocitos. Al mismo tiempo la expresión de ANGPTL8 disminuye evitando que ANGPTL3 inhiba a LPL en músculo esquelético y corazón, ya que

serán tejidos con más necesidad de ácidos grasos. Tras la ingesta, sucede lo opuesto (74) (Ilustración 4). Esta regulación implica una acción paracrina o autocrina de ANGPTL4, lo que ha sido confirmado en WAT, donde el silenciamiento local de ANGPTL4 por sí solo ya provoca mayor captación de triglicéridos (78).

Ilustración 4: Distribución de los ácidos grasos por ANGPTL4, ANGPTL3 y ANGPTL8.

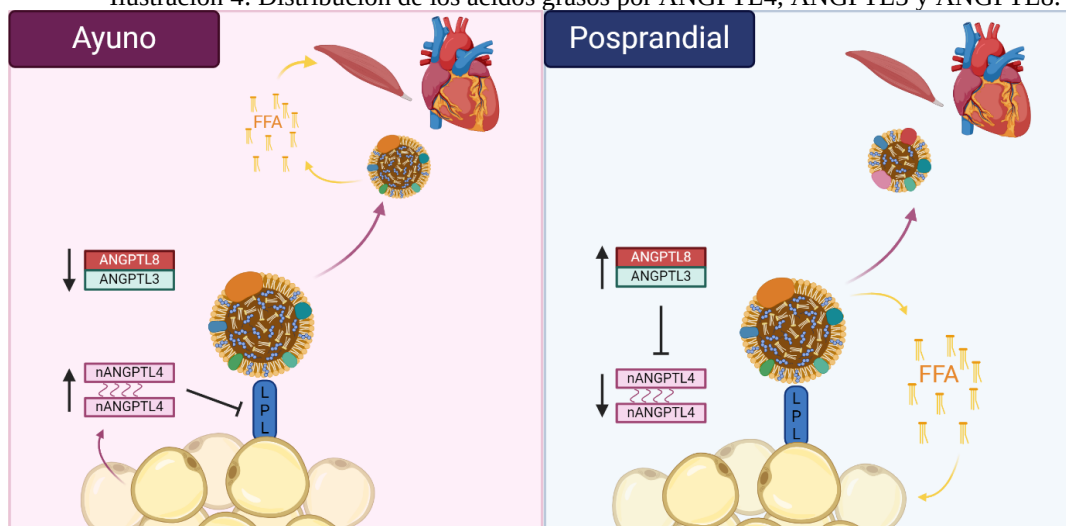


Imagen de elaboración propia en Biorender.

Los mecanismos moleculares por los que ANGPTL4 inhibe a LPL aún están por aclarar, existen evidencias de que podría catalizar la inactivación irreversible de LPL al aumentar su inestabilidad, actuar como un inhibidor reversible no competitivo y promover su escisión intracelular (76,79). Los efectos de ANGPTL4 sobre los triglicéridos son claros; la deficiencia de ANGPTL4 tanto en ratones (80–83) como en humanos (84,85) resulta en una disminución de los triglicéridos circulantes, y la sobreexpresión en ratones los incrementa (82,86). El silenciamiento completo de ANGPTL4 en animales sanos provoca un incremento en el peso corporal, en la masa grasa visceral y en la actividad de LPL (87).

El efecto de la obesidad en los niveles de ANGPTL4 es controvertido. Por un lado, se ha visto que la dieta alta en grasa disminuye su expresión en corazón, hígado y WAT (78,88), y sus niveles circulantes (66), pero también se han correlacionado positivamente sus niveles circulantes en humanos con la edad, el peso corporal el IMC y la masa grasa (89–91). El estudio de la inhibición completa de ANGPTL4 en animales obesos ha encontrado complicaciones metabólicas severas. Al exponer los animales a la dieta alta en grasa se han reportado casos de linfadenopatía abdominal, ascitis quilosa, respuesta de fase aguda o inflamación intestinal grave que reducen la supervivencia (81,83,84). Los ratones con ANGPTL4 adiposo o hepático silenciado ganan más peso con dieta alta en grasa (78,88), y con dieta rica en ácidos grasos insaturados y colesterol (87) por una mayor acumulación de lípidos en el WAT. Sin embargo, en otro estudio, el silenciamiento en tejido adiposo no provoca cambios en el peso, debido a un aumento de la lipólisis, oxidación de ácidos grasos y reducción de su síntesis en el WAT (92). Cuando la dieta alta en grasa se alarga más de 6 meses, ANGPTL4 adiposo pierde su importancia como distribuidor de los triglicéridos, probablemente porque LPL ya no es el factor limitante para la entrada de triglicéridos a los adipocitos (78,88).

Como hemos visto anteriormente, parece ser el ANGPTL4 adiposo el que tiene mayor efecto en los niveles de triglicéridos sistémicos (78). De hecho, ANGPTL4 hepático no parece contribuir significativamente a los niveles plasmáticos de triglicéridos, ni a su captación por el tejido adiposo mediante LPL (88). Sin embargo, algunos estudios de silenciamiento hepático

han encontrado que ANGPTL4 puede inhibir también la lipasa hepática, disminuyendo el catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos, y disminuyendo la activación de AMPK. Se ha visto que, tras 16 semanas de dieta alta en grasa los animales con inhibición hepática de ANGPTL4 parecen protegidos de la obesidad, la esteatosis hepática y la aterosclerosis (93), aunque otros no vieron cambios (88). Además, durante el ayuno, ANGPTL4 hepático inhibe la activación de PPAR α y otros genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos (94).

2.3.1.2 ANGPTL4 en el metabolismo glucémico

ANGPTL4 también ha sido asociado otros efectos en el control del metabolismo energético; las mutaciones genéticas que inhabilitan a ANGPTL4 en humanos se asocian con reducción en los niveles de glucosa (95), y sus niveles circulantes están correlacionados positivamente con mayor riesgo de diabetes tipo dos (89–91). También en humanos, la expresión de ANGPTL4 en tejido adiposo y hepático se relaciona positivamente con los niveles de glucosa en ayuno y con el HOMA-IR (Modelo de Evaluación de la Homeostasis de la Resistencia a la Insulina), sin verse asociación con el IMC (96). Los estudios en modelos animales indican que tanto silenciamientos completos de ANGPTL4 como específicos del tejido adiposo mejoran la sensibilidad a la glucosa y a la insulina (78,87,92), incluso provocando, como ya habíamos visto, mayor acúmulo de grasa (87). Esto podría deberse a que menores niveles de ANGPTL4 permiten que LPL rebaje los niveles de triglicéridos en sangre, impidiendo que se acumulen en tejidos no grasos. Sin embargo, estos efectos parecen perderse tras la administración de una dieta alta en grasa a largo plazo, al igual que se perdían los efectos sobre el metabolismo lipídico (78,92). Por otro lado, estudios con sobreexpresión de ANGPTL4 llegan a conclusiones opuestas, encontrando una mejora de la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (97,98), por lo que su función sobre la regulación de la glucosa aún queda por aclarar.

Curiosamente, los ratones que carecen de ANGPTL4 en adipocitos emularon los fenotipos de la deficiencia total de ANGPTL4 sobre la regulación de los triglicéridos (78), lo que plantea la duda de cuál es la función de su alta expresión en hígado. La expresión de LPL en hígado es baja (51,52,99), y la deficiencia completa de ANGPTL4 no modifica la captación de triglicéridos por el hígado (77). Una posibilidad es que su función en el metabolismo de la glucosa esté relacionada con su participación en la cascada de ceramida glucocorticoide, niveles más bajos de ANGPTL4 disminuyen la producción de ceramida en el hígado, y genera resistencia a la insulina (74), aunque también podría deberse a que ANGPTL4 promueve el almacenamiento graso en tejidos no adiposos, lo que impactan en la homeostasis de la glucosa.

En un modelo de inhibición hepática de ANGPTL4 se ha visto que tras 6 meses de dieta alta en grasa los animales presentan una mejora de la sensibilidad a la glucosa, y se trata de un efecto tardío de la dieta, ya que a las 12 semanas no existía diferencia (88), en otro, tras 16 semanas, disminuye la intolerancia a la glucosa al mejorar su sensibilidad en hígado, músculo y tejido adiposo blanco (93).

Además, la inhibición terapéutica de ANGPTL4 en ratones obesos restaura el correcto metabolismo lipídico y de la glucosa, y disminuye el peso independientemente de la ingesta, probablemente por un aumento en el gasto energético y la actividad locomotora (93), aunque estos efectos de ANGPTL4 hepático sobre el gasto energético no han sido replicados (88).

2.3.1.3 ANGPTL4 en el SNC y la homeostasis energética

ANGPTL4 también muestra expresión en cerebro de humano, rata y ratón (51,52,99), se ha encontrado específicamente en el hipotálamo mediobasal (100). Sin embargo, no hay consenso sobre el tipo celular donde se expresa, ya que aparece coexpresada con marcadores

neuronales y no con marcadores gliales en el ARC (101) y, sin embargo, en otro trabajo no parece detectarse expresión en neuronas aisladas, aunque sí en células gliales (102).

La expresión de ANGPTL4 en el SNC parece regulada por el estado nutricional, hormonas y nutrientes. Al contrario que en tejido adiposo, plasma e hígado, la expresión de ANGPTL4 hipotalámico disminuye con el ayuno y se incrementa con la ingesta y la dieta alta en grasa (100,101). Acorde con esto, la administración central de ANGPTL4 causa anorexia, pérdida de peso y aumento del gasto energético (101), aunque estos efectos no han podido ser replicados (102). Se ha encontrado que las hormonas anorexigénicas leptina e insulina también aumentan la expresión de ANGPTL4 en el hipotálamo, y parecen mediar en sus efectos. Sin embargo, el efecto de la insulina sobre ANGPTL4 también es controvertido, ya que en ratones con diabetes tipo 1 (hipoinsulinémicos e hiperglucémicos) y en ratones ob/ob (hiperinsulinémicos, hiperglicémicos y obesos) ANGPTL4 está sobreexpresado en hipotálamo y, contrariamente a lo descrito en condiciones con dieta control, en diabetes tipo 1 la inyección de insulina revierte la sobreexpresión de ANGPTL4 (102).

Los mecanismos por los cuales ANGPTL4 podría regular la homeostasis energética desde el SNC no están del todo descritos. Aunque algunas de sus funciones están asociadas a señalizaciones intracelulares y no a su regulación de LPL (101), otros estudios sí encuentran asociación. LPL se expresa en el cerebro, especialmente en el hipocampo (103), y se conoce que ciertas lipoproteínas pueden cruzar la barrera hematoencefálica, existiendo receptores para las VLDL (104). Los ratones con inhibición neuronal de LPL sufren una obesidad severa debida a la mayor ingesta y menor gasto energético, junto con incrementos de expresión de AgRP y NPY. Estos ratones presentaban una baja captación de VLDL en el hipotálamo tres meses antes del desarrollo de obesidad (105). En astrocitos, el silenciamiento de ANGPTL4 aumenta la actividad de LPL en el hipotálamo, mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, disminuye la ganancia de peso y la ingesta tras una dieta alta en grasa, probablemente gracias a una mayor excitabilidad de las neuronas POMC (100). Sin embargo, en otro trabajo, el silenciamiento total de ANGPTL4 no pareció modificar ni la expresión de LPL ni su actividad en hipotálamo (102).

2.4 Factor tipo Krüppel 15

KLF15 o KKLf (Factor tipo Krüppel enriquecido en el riñón) es un factor de transcripción que, como el resto de KLFs, se une al ADN mediante *zinc fingers* (106). Se expresa gran variedad de tejidos, pero especialmente en grasa, ovarios, riñón, hígado y cerebro (52), también se ha encontrado expresión en las glándulas mamarias de ratón (51). En el hígado se ha localizado específicamente en el núcleo de células estelares y fibroblastos (107), y tiene una importante función en su diferenciación y desarrollo (106).

La expresión hepática de KLF15 aumenta con el ayuno, y disminuye con la alimentación y la insulina (108). En este tejido, KLF15 es una señal temprana del estado de ayuno para el cambio de lipogénesis a gluconeogénesis. Tras el ayuno se activa el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, resultando en un aumento de glucocorticoides (109). En el hígado, el receptor de glucocorticoides se activa e induce la expresión de KLF15, lo que provoca la inhibición de SREBP-1c, y, por consiguiente, de FASN, la inhibición de la lipogénesis y el aumento de triglicéridos plasmáticos (109–111). El bajo nivel de insulina aumenta los niveles nucleares de FOXOs, la subfamilia de la clase O de los factores de transcripción *forkhead*, esto también estimula KLF15 (111), provoca una elevación de ALT, PRODH, HPD, OTC, PEPCK y G6PC (108,110–113), enzimas que promueven el metabolismo de aminoácidos y la gluconeogénesis. Estudios in vitro en hepatocitos sugieren que la regulación de estos genes por KLF15 podría estar coordinada con PGC1 α (113). De forma opuesta, en estado postprandial FOXO es

fosforilado e inactivado por acción de la insulina (111) (Ilustración 5). Además del estado de alimentación, KLF15 podría estar siguiendo también los ritmos circadianos para su control lipogénico/gluconeogénico ya que se ha encontrado que los factores de transcripción CLOCK/BMAL1 regulan el control que KLF15 tiene sobre el catabolismo de aminoácidos (114).

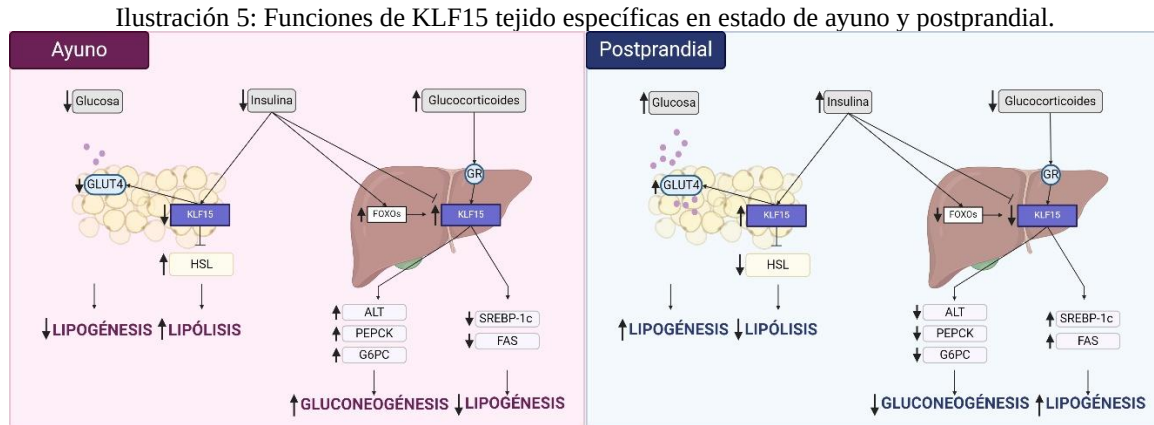


Imagen de elaboración propia en Biorender.

Acorde con la promoción de la gluconeogénesis de KLF15, los modelos animales con silenciamiento sistémico presentan menores niveles de glucosa en ayunas (110,112). También presentan mayor sensibilidad hepática a la insulina y una mejor eliminación de glucosa durante el test de tolerancia a la glucosa (GTT) debido a una reducción marcada de la producción hepática de glucosa. Es importante resaltar que la hipoglucemia en ayunas viene provocada por una menor actividad de ALT en hígado, lo que limita el catabolismo de aminoácidos, y por lo tanto los sustratos para la gluconeogénesis (112). En dieta alta en grasa, los animales con KLF15 silenciado presentan menor peso corporal y masa grasa, su mayor ingesta alimentaria parece verse compensada por mayor actividad física y gasto energético. Al igual que con dieta control, estos animales también presentan mayor sensibilidad a la insulina y menor acumulación lipídica en hígado junto con mayor oxidación de ácidos grasos por su mayor expresión de PGC1 α y CPT1 α (115).

Es suficiente la inhibición hepática de KLF15 para provocar la inhibición de ALT, PEPCK y G6Pase. Aunque esta inhibición local no replicó la hipoglucemia en ayuno que presentaban los animales con inhibición sistémica, sí se encontraron menores niveles de insulina en estado alimentado y menores niveles de glucosa en el test de piruvato (113). Todo ello indica un papel importante de KLF15 hepático en la regulación al alza de la gluconeogénesis.

La regulación de KLF15 hepático durante la obesidad aún no ha sido esclarecida. Los ratones ob/ob tienen menor expresión hepática de KLF15, y su restauración lleva a la mejora de la hipertrigliceridemia al inhibir SREBP-1c, aunque sin modificar su hiperglucemia (110). Sin embargo, también se ha encontrado que la sobreexpresión de KLF15 disminuye la esteatosis hepática a través de vías específicas relacionadas con la inflamación y la función mitocondrial que incluyen a FGF21 (116).

En tejido adiposo la expresión de KLF15 responde de forma contraria que en hígado; disminuye con el ayuno, vuelve a aumentar tras la alimentación y la insulina induce su expresión. Sus funciones en este tejido también son contrarias a las del hígado, promueve la acumulación lipídica (117) y la adipogénesis, aunque el mecanismo está aún por aclarar. Por un lado, se ha demostrado que la lipogénesis es el resultado de la inducción de la expresión de PPAR γ (118), y por el otro no se ha encontrado inducción de este receptor, pero sí del

transportador de glucosa sensible a insulina GLUT4 (119). Además, el silenciamiento de KLF15 suprime la expresión de GLUT4, y aunque no es limitante, también provoca menor captación de glucosa en adipocitos (117). Mientras, en estudios in vivo el silenciamiento específico de KLF15 en tejido adiposo resulta en menor adiposidad y resistencia a la obesidad inducida por dieta sin modificar la ingesta ni la actividad física, una menor lipogénesis y una mayor lipólisis. Una de las formas por las que KLF15 inhibe la lipólisis en adipocitos es a través de la regulación negativa sobre HSL (hormona sensible a lipasa) (117), encargada de la hidrólisis de triglicéridos, de hecho, los ratones deficientes en KLF15 sistémico presentan mayores niveles de ácidos grasos libres (112). En obesidad, se ha encontrado que la expresión de KLF15 está disminuida en tejido adiposo blanco y pardo en ratones y humanos (120,121), y la sobreexpresión específica en estos tejidos genera resistencia a la obesidad inducida por dieta. Estos ratones también desarrollaron mayor acumulación grasa en hígado y mayor resistencia a la insulina, pero su mayor capacidad de secreción de insulina debida a un menor nivel de estrés oxidativo resultó en mejor tolerancia a la glucosa (121).

En resumen, en ayuno KLF15 aumenta en el hígado para promover la gluconeogénesis y disminuir la lipogénesis, aumentando la disponibilidad de glucosa. En adipocitos en cambio, sus niveles disminuyen en ayuno para que disminuya la lipogénesis y aumente la lipólisis, y así liberar ácidos grasos a la circulación para su utilización. También tiene funciones en la utilización de ácidos grasos en el músculo esquelético (122) y corazón (123), por lo que la regulación que tiene KLF15 sobre los recursos energéticos puede afectar a muchos más tejidos.

2.5 Proteína nuclear asociada a Btg3

BANP o SMAR1 (proteína 1 de unión a la región de anclaje de andamiaje/matriz), es una proteína asociada a la matriz nuclear que desempeña un papel clave en la organización de la cromatina dentro del núcleo celular. Este tipo de proteínas, conocidas como proteínas de unión a regiones de anclaje de la matriz (MARBPs), se unen a estas regiones organizando la cromatina en dominios estructurales específicos. La desregulación de las MARBPs puede alterar la organización de la cromatina y afectar la transcripción genética, contribuyendo al desarrollo de cánceres. Debido a su papel en la organización nuclear, algunas MARBPs se consideran potenciales marcadores diagnósticos o pronósticos en ciertos tipos de cáncer (124).

BANP regula negativamente la actividad de P53, modulando tanto su capacidad para detener el ciclo celular como para inducir apoptosis (125,126). *TP53*, el correspondiente gen de p53, es uno de los supresores tumorales que con más frecuencia está inactivado en el cáncer humano (127). Además, *TP53* también cumple importantes funciones en el metabolismo energético: participa en rutas de detección de energía, ya que es activado por AMPK en estados de estrés energético (128), sus niveles elevados en tejido adiposo provocan resistencia a la insulina (129), tiene un importante papel en la diabetes tipo 2 al controlar la producción hepática de glucosa (130), su presencia en neuronas AgRP es necesaria para permitir adaptaciones en contra de la obesidad inducida por dieta, (131) y su activación moderada y temporal parece ser clave para generar un efecto beneficioso sobre la MAFLD (132,133).

La relación descrita entre BANP y P53 implica la posibilidad de que regule también alguna de las funciones que se conocen de P53 en el metabolismo energético. Se ha encontrado que, bajo privación de glucosa, BANP aumenta sus niveles en el citoplasma y participa en la inducción de una de las isoformas de P53 (134). Además, su silenciamiento promueve la acumulación lipídica y la diferenciación de los adipocitos, funcionando como un regulador negativo de la adipogénesis a través de supresión de PPAR γ (135).

2.6 Termogénesis del tejido adiposo pardo

La termogénesis adaptativa es uno de los componentes del gasto energético, junto con el metabolismo basal y la actividad física, y se puede dividir en termogénesis inducida por dieta e inducida por frío (136). Se trata de la producción de energía en forma de calor, y ocurre en mayor o menor medida en todos los tejidos, ya que es inevitable cierta ineficacia de la producción y utilización del adenosín trifosfato mitocondrial (ATP). Sin embargo, la termogénesis es la función específica del tejido adiposo pardo y beige. Su marcador exclusivo es la expresión de la proteína desacoplante 1 o termogenina (UCP1), un canal de protones alternativo al ATP sintasa, que desacopla el gradiente de protones de la generación de ATP (36). Otras características que diferencian el tejido BAT del WAT es la existencia de muchas gotas lipídicas, más pequeñas y rodeadas de mayor cantidad de mitocondrias. Además, el BAT está altamente vascularizado e innervado por gran cantidad de fibras del sistema nervioso simpático (137), lo que permite su activación mediante la estimulación de los receptores adrenérgicos β_3 por la noradrenalina (138,139) y modifica su capacidad termogénica (número de adipocitos y de mitocondrias) y la expresión de UCP1 (140). El hipotálamo y el tronco cerebral son las áreas reconocidas como reguladoras de la actividad del BAT, atendiendo a la temperatura corporal y al balance energético (141).

La termogénesis del BAT contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal y a la producción de fiebre (37). En roedores y bebés el BAT es la mayor fuente de termogénesis sin escalofríos (142,143) y se ha demostrado su presencia y actividad metabólica en humanos adultos (144–146). La exposición aguda al frío activa el BAT en cuestión de minutos generando un incremento en la termogénesis (140,147). El resultado de la activación del BAT es la lipólisis de las reservas intracelulares de triglicéridos, lo que produce ácidos grasos libres que sirven de combustible a la mitocondria (148) y la internalización de glucosa circulante (141) que contribuye a la síntesis de triglicéridos (149). De hecho, la técnica más ampliamente utilizada para localizar y medir el BAT en humanos es por la internalización de la 2-[^{18}F]fluoro-2-desoxi-glucosa. La localización del BAT se ciñe a depósitos en la región interescapular en roedores y bebés, en humanos adultos se encuentran mayoritariamente en el área supraclavicular, cuello y tórax. Estos depósitos parecen disminuir con la edad, la temperatura, el IMC y la diabetes, y se conservan mejor en las mujeres (144,146,150,151). Aunque bien es cierto que la tasa de detección del BAT en humanos varía, siendo a veces dependiente de la exposición al frío y de la dosis de 2-[^{18}F]fluoro-2-desoxi-glucosa.

En la exposición a largo plazo al frío las células adiposas blancas pueden ser inducidas a un pardeamiento convirtiéndose en células adiposas más parecidas a las marrones, que ya mencionamos antes y usualmente se denominan como beige. Esta plasticidad también se produce a través de la activación de los receptores adrenérgicos β_3 y es reversible; las temperaturas cálidas reconvierten los adipocitos beige en blancos (152). En roedores, la capacidad de inducir adipocitos beige es diferente dependiendo del fondo genético del animal (153). Podemos deducir la importancia de estas células para el metabolismo energético por el hecho de que aquellas líneas con más potencial inductor de adipocitos beige son menos propensas a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina tras una dieta alta en grasa, y viceversa, las líneas con menos potencial inductor son más susceptibles a la obesidad (148). Además, los tratamientos que impiden la termogénesis del BAT, como la ablación del tejido, la delección de UCP1 o de los receptores adrenérgicos β_3 , vuelven a los animales más sensibles a la obesidad inducida por dieta (154,155), aunque existen resultados contradictorios (156,157). También se han relacionado variantes genéticas de UCP1 con aumento de peso en humanos (141). Todo ello, junto con la asociación de un alto IMC con baja actividad del BAT en humanos, llevan a plantearse si el BAT pudiera estar incrementando la capacidad de gasto

energético significativamente, convirtiéndose en una posible diana para el tratamiento de la obesidad.

Ciertamente, al BAT se le ha asociado un posible papel en la termogénesis inducida por dieta que podría funcionar como un mecanismo para mantener el balance energético, y que, además, podría ser comparable al su potencial termogénico inducido por frío (158). Sin embargo, se ha calculado que su aporte al gasto energético podría ser de 7 a 123 kcal/día a temperatura ambiente (141,159), lo que no parece muy significativo. Aunque se debe tener en cuenta que estas aproximaciones no tienen en cuenta el gasto que podría aportar el pardeamiento del WAT, además de las limitaciones que plantean las técnicas de medición.

El estudio del papel del BAT en la regulación de la homeostasis energética ha llevado a relacionar núcleos del hipotálamo como el ARC, DMH y VMH con el control de la termogénesis del BAT (141,160), al igual que el sistema de melanocortina (161). Nuestro grupo ha podido describir un mecanismo hipotalámico inédito que regula la termogénesis del BAT a través del receptor dopaminérgico D2 (DRD2) del LHA y *zona incerta* (162). Más tarde, hemos podido demostrar que esta vía es imprescindible para el aumento de la termogénesis del BAT que produce el FGF21 circulante procedente del hígado (41). Por lo que podrían quedar más rutas de activación del BAT por descubrir relacionadas con el balance energético.

3 Lactancia materna

Las recomendaciones de la OMS son iniciar la lactancia materna en las primeras horas del nacimiento y mantener esta alimentación exclusiva con leche materna hasta las 6 semanas de vida. Excluyen cualquier otra bebida aparte de leche, incluyendo el agua, y recomiendan solo la alimentación directa del pecho. La alimentación complementaria se aconseja a partir de los 6 meses, continuando con el amamantamiento hasta los 2 años o más (163).

Las tasas de lactancia materna son complicadas de calcular por la dificultad de recabar información fiable. La OMS ha hecho muchos esfuerzos por aumentar sus niveles en países de bajos ingresos, por la problemática que genera el uso de alimentos no seguros para los bebés. En 2018 UNICEF estimaba en un 4 % la lactancia materna exclusiva en los 6 primeros meses de vida en los países de ingresos bajos y medios, y en un 21% en países de altos ingresos (164). El informe de los indicadores de la lactancia materna global generado por UNICEF y la OMS calcula que en el 2023 ya eran un 48 % de niños que recibían lactancia materna en el mundo, pero este informe incluye muy pocos países europeos (165).

Un detallado estudio del 2016 pudo cuantificar los niveles de lactancia prolongada incluyendo, aparte de países con bajos ingresos, 37 países con altos ingresos. España, Francia y Estados Unidos presentaban la ratio más baja de lactancia materna, menos del 80 % de los bebés fueron amamantados. El inicio temprano de la lactancia (a las horas del nacimiento) fue bajo para casi todos los países (en torno al 50 %), al igual que la lactancia exclusiva hasta los 6 meses (50% países de bajos ingresos y 30 % países de ingresos medios). Además, son los países con mayores ingresos los que menor prevalencia de lactancia materna presentaron a partir de los 6 meses, menos del 20 % (166).

El auge del uso de fórmulas para la alimentación infantil es un posible causante de la disminución de la alimentación materna en los países con altos ingresos, y sólo en los últimos años se han revalorizado los beneficios de la lactancia. La investigación sobre la leche materna y el efecto que produce en la descendencia es clave para dirigir la población a la mejor alimentación posible.

3.1 Composición de la leche materna

La composición de la leche no sólo incluye los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo (carbohidratos, vitaminas, lípidos y proteínas), sino que también contiene factores bioactivos como virus (167), citoquinas y quimioquinas (168,169), exosomas (170), ciertas clases de ácidos grasos (171), bacterias (172), células inmunitarias, anticuerpos (173) y hormonas (174).

La cantidad y clase de estos elementos son dependientes de la población o etnia, del momento de lactancia, la dieta de la madre o su exposición a químicos y enfermedades. Esto convierte a la leche materna en una vía de comunicación directa entre la madre y el bebé. Es tal la variación de la composición de la leche, que incluso cambia dentro de la misma toma. La leche que es extraída al principio tiene menos grasa y más contenido en lactosa, y al final su contenido de grasa comienza a aumentar (175). En cuanto a las variaciones a largo plazo, la leche materna se suele dividir en tres clases; calostro, intermedia y madura. El calostro, leche obtenida durante la primera semana tras el parto, tiene mayor concentración de inmunoglobulinas, citoquinas, células inmunitarias (169), y proteína, lo que le proporciona efectos antiinflamatorios y antiinfecciosos, ayuda a la colonización intestinal, al desarrollo inmunitario y al crecimiento (176). Mientras, la grasa y la lactosa se mantienen bastante constantes a lo largo del tiempo (175). A partir del año del parto, el cambio de la composición de la leche no está clara; varios estudios apuntan a que la cantidad de proteína y lípidos aumentan mientras que los hidratos de carbono disminuyen, otros no encuentran diferencias (177).

Hormonas asociadas al control del metabolismo energético como la leptina, la adiponectina, la grelina, la insulina, la nesfatina y la obestatina ya han sido identificadas en la leche materna. Además, estas moléculas podrían mantener su función biológica en el bebé debido a la inmadurez de su aparato digestivo (178). Los niños alimentados con leche materna presentan mayores niveles de leptina que los alimentados con leche de fórmula (179,180), y a mayores niveles de leptina en leche materna, menores niveles de IMC y z-score en el bebé (181–183), lo que nos lleva a suponer su funcionalidad en el control de la saciedad. La grelina presenta mayores niveles plasmáticos en bebés alimentados por fórmula y parece relacionarse con mayor ganancia de peso en el primer año de vida (179). En la leche materna sus niveles parecen aumentar progresivamente con el tiempo (184), por lo que el momento de la exposición a la grelina podría ser importante, al igual que una lactancia prolongada. Otra hormona muy estudiada en la leche es la insulina, mayores niveles se han relacionado con menos peso corporal al mes de vida (185), aunque podría ser que esta relación no fuera lineal, ya que tanto niveles bajos como altos se asociaron con mayor z-score a los 4 meses (183).

Establecer los mecanismos funcionales por los cuales estas hormonas u otros componentes podrían estar generando algún efecto en el desarrollo de la obesidad es crucial para esclarecer la hipótesis de que la leche materna es beneficiosa para la salud.

3.2 Lactancia y obesidad

Los factores de riesgo en la etapa perinatal son claves para el correcto desarrollo del individuo, pero su estudio individualizado suele ser infructuoso, ya que suelen coexistir y tener un efecto acumulativo. Debemos tener en cuenta que estos factores pueden provenir de hasta el momento de la concepción, pasando por el ambiente intrauterino y la alimentación perinatal (186), y muchos de ellos, como el tabaquismo parental, exceso de ganancia de peso gestacional, falta de lactancia materna, diabetes gestacional, nacimiento prematuro, alto o bajo peso al nacer pueden estar agrupados en ciertos patrones socioeconómicos (187).

Existe consenso en la importancia de la nutrición perinatal para el desarrollo de la obesidad, y también en el beneficio de la lactancia materna para la salud en general, pero su implicación en un efecto protector contra la obesidad es controvertida (187). La relación entre el haber recibido leche materna y padecer obesidad ha sido estudiada en múltiples análisis epidemiológicos, algunos de ellos han encontrado que la lactancia materna tiene un efecto protector contra la obesidad en la infancia y en la etapa adulta (188–191), mientras que otros no han hallado tal correlación (192,193), o incluso han relacionado mayor tiempo de lactancia con más riesgo de obesidad (194). Esta discrepancia puede ser debida a diferentes tamaños de muestra o a otros factores de confusión como la etnia (195). El último metaanálisis publicado en 2020 encuentra una disminución del riesgo de sufrir obesidad del 17 % para aquellos niños que tuvieron lactancia materna en comparación con los que no la tuvieron. Además, este estudio encontró un efecto de dosis respuesta; la disminución del riesgo de obesidad era del 4 % con lactancias hasta los 3 o 6 meses, y del 33 % si duraban más de 6 meses (196).

Encontrar los mecanismos por los cuales la lactancia materna y sus componentes podrían ejercer este posible efecto protector de la obesidad aclararía las dudas sobre su importancia en esta enfermedad. Se ha demostrado que en etapas posnatales tienen lugar modificaciones epigenéticas que afectan al correcto desarrollo del tejido adiposo, del intestino, del hígado y del hipotálamo y sus conexiones periféricas (197), órganos importantes para la regulación energética (16). Las modificaciones epigenéticas como metilaciones del ADN, acetilaciones de histonas o ARNs no codificantes resultan en cambios en la expresión de genes al silenciar o incrementar su transcripción. Por ejemplo, se ha encontrado disminuida la expresión de FTO y CPT1 α en bebés y niños con lactancia materna, y aumentada la de PPAR α en células mononucleares circulantes (198), todos ellos genes importantes para el balance energético.

Para estudiar el efecto de la lactancia materna en la programación epigenética de la obesidad se han utilizado modelos animales con un ambiente controlado, teniendo en cuenta que sus niveles de inmadurez al nacer son más altos que los nuestros (16). Técnicas como el uso de fórmulas alimenticias, reducción de camadas, crianza entrecruzada con madres obesas o cambio de alimentación de la madre dan información sobre el efecto de la leche materna en la descendencia (199). De esta forma se han encontrado evidencias de que la leptina ingerida como componente de la leche materna desempeña un papel en la programación postnatal de un fenotipo saludable en la edad adulta, generando cambios de expresión de genes clave del control de la ingesta en el SNC como la POMC, o manteniendo la abundancia de receptores de leptina en el tejido adiposo tras una dieta alta en grasa (200). Este hecho es consistente con la asociación que veíamos anteriormente entre leptina e IMC en bebés.

Son menores los estudios que centran su atención en la duración de la lactancia. Por ahora sabemos que la mayor duración de la lactancia materna se asocia con alteraciones epigenéticas en el gen de la leptina en niños (201), y con un mejor perfil lipídico en niños de hasta 14 años (202), aunque estas alteraciones no se han encontrado en adultos jóvenes (203).

En nuestro grupo de investigación llevamos años estudiando el efecto de la lactancia prolongada sobre el metabolismo energético, exponiendo a ratas mayor tiempo de lactancia y comprobando su respuesta a una dieta alta en grasa. Hemos podido observar como las ratas adultas con lactancia prolongada y dieta alta en grasa presentan menor peso corporal que aquellas con lactancia estándar, sin que la ingesta se vea modificada. La caracterización del modelo mostró mejoras en el perfil lipídico circulante, disminuyendo los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos. Además, mostramos que la lactancia prolongada activa la termogénesis en el BAT y aumenta el gasto energético en ratas con obesidad inducida por dieta. Siguiendo en esta dirección, analizamos la proteína FGF21, por estar relacionada con la estimulación del programa termogénico del BAT, y demostramos que en hígado y plasma de

ratas con lactancia prolongada estaba elevada. Mediante diferentes técnicas de terapia viral, conseguimos demostrar que el FGF21 hepático llega al LHA, y a través de su receptor en neuronas GABAérgicas que expresan DRD2 activa la termogénesis del BAT, aumenta el gasto energético y genera resistencia a la obesidad inducida por dieta (41).

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Establecer el modelo de lactancia materna prolongada con y sin dieta alta en grasa. Caracterizar metabólicamente el modelo (peso, ingesta, composición corporal).
2. Determinar proteínas hepáticas y plasmáticas que se encuentran modificadas en los animales sometidos a lactancia materna prolongada mediante técnicas de secuenciación masiva.
3. Seleccionar de entre las proteínas modificadas varias candidatas que puedan estar relacionadas con el fenotipo metabólico que presentan las ratas con lactancia prolongada. Validar estas proteínas en el modelo y determinar si están presentes en leche.
4. Buscar posibles interacciones entre las proteínas encontradas y otras cuya función ya esté descrita en el modelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Animales de experimentación

Los experimentos con animales han sido realizados en el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) de la Universidad de Santiago de Compostela, que se encuentra inscrito en el Registro de centros de cría, suministradores y usuarios con el número ES150780292901. Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la ejecución de la presente tesis han sido sometidos a una revisión exhaustiva y aprobados previamente por el comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela. Esta evaluación se llevó a cabo bajo el procedimiento con expediente número 15010/17/007 del Prof. Rubén Nogueiras Pozo, quien supervisó directamente dichos procedimientos junto a la Dra. Luisa María Seoane Camino y el Dr. Omar Al-Massadi Iglesias. Estos procedimientos se realizaron en conformidad con el marco legislativo vigente, incluyendo la Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, así como el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, que establece las normas básicas para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Además, la autora de la tesis cuenta con certificados de capacitación (según el orden ECC/566/2015) expedidos por la Consellería do Medio Ambiente - Xunta de Galicia, con los códigos b596 y c637, respaldando así su competencia en la realización de los procedimientos en cuestión.

Teniendo en cuenta las implicaciones éticas asociadas a la experimentación animal, se ha considerado en todos los diseños experimentales el principio del reemplazo, reducción y refinamiento. El estudio de respuestas orgánicas que se pretende en esta tesis imposibilita utilizar métodos alternativos a la experimentación animal, pero se han reducido al mínimo el número de animales utilizados sin afectar a la robustez del modelo estadístico. Además, los análisis in vivo y la recolección de muestras han sido proyectados para cumplir los objetivos de distintos estudios a la vez, siempre que esto fuera posible. Por último, se ha contado siempre con personal con experiencia técnica en el experimento a realizar, para asegurar la reducción del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero en los animales.

Los modelos animales que han sido utilizados en esta tesis son los siguientes

- Ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley procedentes del área de cría del CEBEGA.
- Ratón de tipo salvaje (C57BL/6J) procedentes del área de cría del CEBEGA.

Los animales han sido mantenidos en condiciones SPF (*specific-pathogen-free*) a una temperatura estable ($22 \pm ^\circ\text{C}$) y ciclos alternos de luz (12 h luz / 12 h oscuridad), con acceso libre a dieta estándar (61,3 % carbohidratos, 25,2 % proteínas y 13,5 % grasas) y a agua, excepto en los procedimientos experimentales en los que se especifique otra condición.

La asignación de los animales en los grupos experimentales fue aleatoria. Se estabularon colectivamente con enriquecimiento ambiental para preservar su comportamiento social y respetando el espacio mínimo asignado por animal. Se ha valorado periódicamente el estado físico de los animales y monitorizado su masa corporal e ingesta (representada siempre como ingesta total dividida por el número de individuos por caja). Este seguimiento también permite acostumbrar a los animales a la manipulación y reducir el estrés generado durante los experimentos.

1.1 Anestesia y analgesia

Muchos de los procedimientos utilizados que se explicarán a continuación necesitan el uso de anestesia general de media duración, que en este caso fue administrada mediante inyección

intraperitoneal (pág. 41). Los componentes de esta anestesia son la Ketamina y Xilacina, y sus dosis se indican en la Tabla 3. Se generó una solución diluyéndolos en suero salino con una concentración suficiente como para no exceder los volúmenes recomendados de inyección de sustancias pero que a la vez fuera sencillo su manejo con la jeringa.

Para evaluar el plano anestésico del animal se comprobó el reflejo podal y palpebral, considerando que su ausencia como indicio para comenzar el procedimiento quirúrgico. Durante la operación también se ha prestado atención a otras respuestas reflejas como cambios bruscos del patrón, frecuencia o profundidad de la ventilación para detectar planos anestésicos insuficientes y valorar la reinyección de anestesia en menor cantidad.

Finalmente, al término de la operación de cada animal, aprovechando la anestesia, se ha inyectado vía subcutánea (pág. 42) Meloxicam como analgésico a la dosis indicada en la Tabla 3.

Tabla 3: Componentes de la anestesia¹

	Ketamina ²	Xilacina ³	Meloxicam
Rata	80	8	1
Ratón	100	20	0.3

¹ Unidades en mg/Kg

² Tabla 21, Ref1

³ Tabla 21, Ref.2

En otros casos la anestesia con isoflurano fue suficiente, como operaciones menores o manipulaciones que pueden resultar muy estresantes para los animales. En estos casos se utilizó una mezcla de oxígeno con isoflurano a una concentración del 5 % para inducir la anestesia en una cabina de metacrilato, y a una concentración del 2 % para el mantenimiento con mascarilla.

1.2 Modelos Animales

1.2.1 Modelo de lactancia materna prolongada

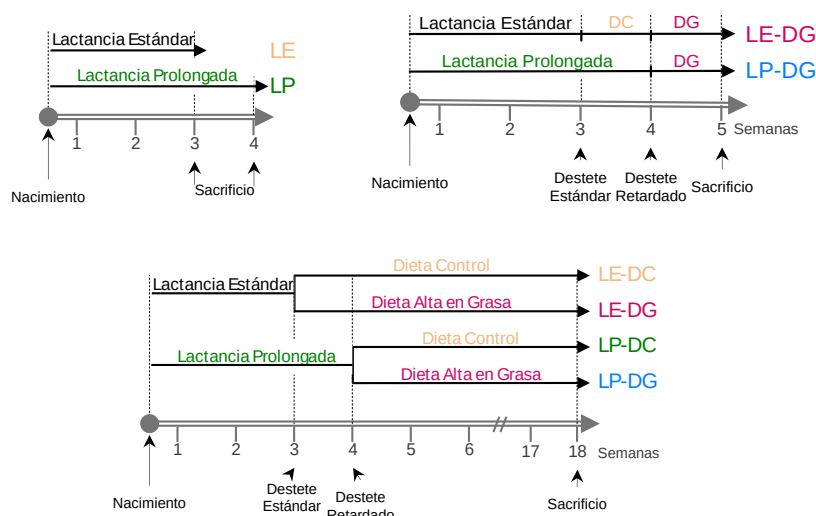
Se utilizaron camadas de ratas macho y hembra normalizadas a 12-16 crías. En el grupo de destete estándar (LE) se separaron las crías a los 21 días de edad. En el grupo de destete retardado (LP) la separación se retrasó hasta los 28 días de vida. En todos los casos, los experimentos han sido realizados con ratas macho, descartándose al momento del destete las hembras. Tras el destete, los grupos se subdividieron en el grupo de dieta control (DC) o dieta alta en grasa (DG).

De esta forma el experimento finaliza con cuatro grupos experimentales:

- LE-DC: Lactancia estándar – dieta estándar
- LP-DC: Lactancia prolongada – dieta estándar
- LE-DG: Lactancia estándar – dieta alta en grasa
- LP-DG: Lactancia prolongada – dieta alta en grasa

Los animales se mantuvieron estabulados por grupos para llevar un seguimiento de su intesta además de su peso hasta el día del sacrificio. Se generaron tres versiones de este modelo dependiendo de si el objetivo era estudiar el efecto de la lactancia prolongada a largo o a corto plazo. En el primer caso las ratas se sacrificaron a las 18 semanas, cuando ya son adultas, en el segundo se realizaron sacrificios justo tras el destete (a las 3 semanas para LE y 4 para LP) o las 5 semanas de vida, tras una semana de dieta alta en grasa.

Diagrama 1: Modelos de lactancia prolongada

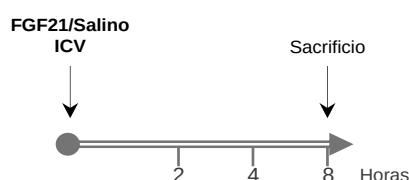


1.2.2 Modelo de administración central de FGF21

Para la administración vía intracerebroventricular (ICV) de FGF21 se establecieron ratas adultas macho de entre 200 y 280 g, dejando 4 días de adaptación antes del experimento. Se realizó una canulación cerebral (pág. 42) y tras 4 días de recuperación se administró FGF21 humano (Tabla 21, Ref.3) a través de la cánula a una dosis de 0.4 ug/rata. Esta dosis fue establecida previamente en el laboratorio mediante pruebas de dosis respuesta, siendo esta la concentración más baja de FGF21 probada que provocó los efectos esperados, es decir, un aumento de la termogénesis analizada por cámara termográfica del tejido adiposo pardo (BAT).

Tras la inyección se realizaron fotos térmicas para comprobar la temperatura del BAT e inmediatamente se sacrificaron los animales a las 2, 4 y 8 horas.

Diagrama 2: Modelo de administración ICV de FGF21



1.2.3 Modelo de inhibición hepática de FGF21

Este experimento comienza con la realización del modelo de lactancia prolongada, generando sólo los grupos LE-DG y LP-DG. La administración del lentivirus se realizó cuando las ratas alcanzaron las 11 semanas de edad por medio de una inyección en la vena de la cola (pág.42).

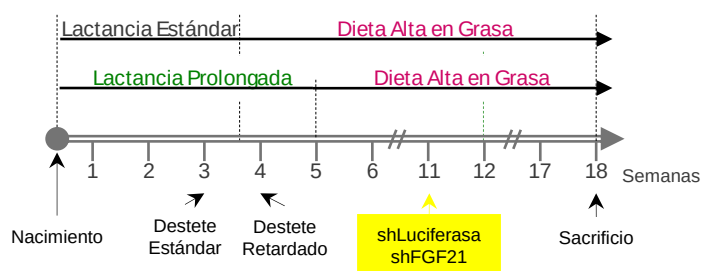
Las partículas lentivirales utilizadas fueron diseñadas y generadas en el laboratorio del Dr Miguel Fidalgo (Stem Cells & Human Diseases laboratory, CIMUS, Santiago de Compostela-España). Los oligos con dianas transcripcionales para FGF21 y Luciferasa se sintetizaron y subclonaron en el plásmido pLKO.1. Las construcciones shRNA (ARN de horquilla corta) fueron finalmente confirmadas por la secuenciación de Sanger. Las secuencias de destino de los shRNAs utilizados fueron las siguientes:

sh-Luciferasa: CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG;

sh-FGF21: TCTCTATGGATCGCCTCACTT

El volumen final de vectores lentivirales por rata fue de 500 uL (1×10^9 PFU / mL).

Diagrama 3: Modelo de silenciamiento hepático de FGF21



1.3 Procedimientos experimentales

1.3.1 Manipulación del estado nutricional

La alimentación con dietas modificadas permite el estudio de los diferentes aportes de grasa u otros nutrientes. Las dietas proporcionadas han sido dieta estándar (Tabla 21, Ref.4) y dieta alta en grasa (Tabla 21, Ref.5), cuya composición calórica de macronutrientes se encuentra indicada en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición de dietas

	Estándar	Alta en grasa
Energía (Kcal/g)	3,10	4,73
Materia grasa (% Kcal)	6	45
Proteínas (% Kcal)	19	20
Carbohidratos (% Kcal)	44	35

1.3.2 Resonancia magnética nuclear

Se utiliza un sistema de resonancia magnética nuclear (Tabla 22, Ref 1) para diferenciar la masa grasa y magra. El animal es completamente inmovilizado en un cepo, se realizan las mediciones por duplicado y se utiliza la media.

1.3.3 Temperatura interescapular

La aumentada temperatura interescapular es uno de los indicadores de una elevada termogénesis en el tejido adiposo pardo. Para realizar esta medición se rasuraron los animales en esta zona el día anterior, o como mínimo 3 horas antes de realizar las fotografías. Se utilizó una cámara infrarroja de alta resolución (Tabla 22, Ref 2) estableciendo un rango de medición de entre 30 y 40 °C. Se analizaron 3 fotos de cada rata donde el área interescapular estuviera bien enfocada, de frente a la cámara y totalmente visible. Para ello se utilizó el software FLIR Tools (Tabla 23, Ref. 1), obteniendo la mediana de temperatura de toda el área interescapular en cada fotografía, y realizando la media de las 3 medidas.

Para controlar que el aumento de la temperatura interescapular no estuviera asociado a un aumento de la temperatura corporal se registró esta medida mediante una sonda rectal específica de rata o ratón conectada a un termómetro digital (Tabla 22, Ref. 3). Sólo se consideraron aceptables aquellos experimentos con una temperatura corporal similar en todos los grupos.

1.3.4 Administración intraperitoneal

La administración intraperitoneal (IP) se realiza sin anestesia con el animal inmovilizado desde la espalda inclinando ligeramente la cabeza hacia abajo, así el paquete visceral caerá hacia la cabeza liberando presión en la zona de inyección. Buscando un ángulo de 30° con el

vientre, se inserta una aguja de 25 G acoplada a una jeringa de 1 mL en la parte ventro-caudal del animal, preferiblemente en su lado derecho y nunca en el centro, para evitar la vejiga. La inserción debe terminar en cuanto cese la resistencia ejercida por piel y músculo, se libera el contenido de la jeringa y se extrae la aguja manteniendo el ángulo.

1.3.5 Administración por vena de la cola

Esta vía de administración permite la administración vía intravenosa de compuestos dirigidos al hígado, se realiza sin anestesia e inmovilizando la rata en un cepo (Tabla 22, Ref 4). En primer lugar, se dilatan las venas de la cola acercando una lámpara de luz infrarroja durante unos 30 segundos. Se localiza una de las venas laterales y con una aguja de 27 G se inyecta de forma superficial y casi paralela a la cola, asegurándose de que el contenido es arrastrado por el flujo venoso sin ofrecer resistencia.

1.3.6 Administración subcutánea

Las sustancias administradas por vía subcutánea (SC) se absorben más lentamente que vía IP, por eso se ha escogido para la analgesia posterior a una cirugía. Para su realización se crea un pliegue de piel con los dedos índice y pulgar en el dorso del animal, y se introduce la aguja debajo paralelamente a la superficie corporal. Tras su correcta administración puede observarse un abultamiento de la zona.

1.3.7 Administración intracerebrovascular

La administración ICV de un fármaco permite alcanzar el fluido cerebroespinal sorteando la barrera hematoencefálica.

Primeramente, es necesaria la implantación ICV de las cánulas. Estas, fueron fabricadas a partir de un tubo de polietileno de 20 G para rata (1,09 mm de diámetro externo y 0,38 mm de diámetro interno. (Tabla 22, Ref. 5) y 22 G para ratón (0,58 mm de diámetro interno y 0,96 de diámetro externo, (Tabla 22, Ref. 6). Uno de los extremos de la cánula se corta de forma biselada, con un tamaño de bisel de 0.5 mm. Se adhiere un tope alrededor de la cánula a 4 mm para rata y 2.5 mm para ratón del extremo del bisel. El extremo opuesto o superior de la cánula queda sellado por calor.

Para la colocación de las cánulas se debe realizar una cirugía esterotáxica bajo anestesia general. La esterotaxia consiste en la localización tridimensional de un punto en concreto del cuerpo, aunque generalmente se realiza en cerebro por la facilidad de encontrar puntos de referencia superficiales.

Tras rasurar la zona, se realiza un corte sagital en la piel superior al cráneo para dejar el hueso visible. Se coloca la rata en el aparato esterotáxico (Tabla 22, Ref. 7) ajustando los adaptadores de forma que la cabeza de la rata quede fija y plana. El punto de referencia utilizado es el bregma, el punto craneal en el que confluyen las suturas del hueso frontal con los huesos parietales. En el esterotáxico se coloca una aguja guía que se desplaza hasta tocar en el bregma, y se miden sus coordenadas. A estas coordenadas se les debe sumar o restar los valores indicados en la Tabla 5 correspondientes al ventrículo lateral. Se puede escoger cualquiera de las coordenadas laterales, ya que acceder al ventrículo por uno de sus lados es suficiente para que el reactivo inyectado acceda a todo el ventrículo en su conjunto. En el punto localizado mediante las coordenadas anteroposterior y lateral se realiza una perforación en el cráneo con una broca quirúrgica, y se inserta la cánula por su extremo biselado. Nótese que el tope de cánula supera en 0.5mm a la coordenada dorsoventral, contando así con el tamaño del bisel.

Una vez la implantada la cánula se aplicó cianocrilato (Tabla 21, Ref. 6) para fijar la cánula al cráneo y cerrar el corte. Tras la operación los animales recibieron analgesia y fueron

estabulados individualmente dejando por lo menos 3 días de recuperación para los ratones, y 4 para las ratas.

1.3.8 Administración núcleoespecífica

Vía utilizada para la administración de sustancias en núcleos específicos del hipotálamo. Igual que en el apartado anterior, se realiza mediante la cirugía esterotáxica.

Una vez cortada la piel craneal y colocado el animal en el aparato esterotáxico (Tabla 22, Ref. 7), se debe utilizar una jeringuilla de microinyección específica para ratón (Tabla 22, Ref. 8) o para rata (Tabla 22, Ref. 9) para localizar el bregma. A partir de las coordenadas del bregma se calculan las del núcleo de interés en cada uno de los hemisferios, según la Tabla 5, se perfora el cráneo con una aguja de 20 G para así acceder a la coordenada dorsoventral con la jeringuilla Hamilton.

Con el fin de que el reactivo penetre correctamente en el tejido neuronal y no cree sobrepresiones se ha mantenido un flujo de inyección de 200 nl/min durante 5 minutos para las ratas, y 15 minutos para los ratones, inyectando así un volumen final de 1 uL.

Al terminar la administración, se cierra el corte de la piel con seda de sutura, se administra analgesia y se estabulan los animales controlando su recuperación.

Tabla 5: Coordenadas esterotáxicas desde el bregma¹

		AP ²	L ³	DV ⁴
Núcleo lateral	Rata	-2.85	±2	-8.1
	Ratón	-1.3	±1.1	-5.2
Ventrículo Lateral	Rata	-0.9	±1.5	-3.50
	Ratón	-0.6	±1.2	-2

¹ Unidades en mm.

² Anteroposterior

³ Lateral

⁴ Dorsoventral

1.4 Extracción de leche

Tras el destete, las madres de las camadas utilizadas para los distintos modelos animales son estabuladas individualmente durante 4 horas aproximadamente, para permitir la acumulación de la leche. Para la extracción se anestesia el animal con isoflurano y se administran 5 UI de oxitocina por vía SC para favorecer la bajada de la leche. A continuación, mediante un masaje mamario se ordeña a la rata y se acumula la leche en un tubo de 1,5 mL para guardarlo en frío. Inmediatamente tras la extracción se centrifuga a 800 g 10 min a 4 °C para eliminar parte de la grasa, y se guarda a -80 °C para su posterior uso.

1.5 Eutanasia

Al término de los procedimientos se utilizó la decapitación para el sacrificio. En el caso de las ratas, previamente a la decapitación se realiza unha conmoción cerebral generando un golpe decisivo en la cabeza con un objeto contundente como lo es la mesa quirúrgica. De esta manera el animal está totalmente aturdido e inconsciente en el momento de la decapitación. Se trata de un sistema que necesita de experiencia técnica y se realiza por la necesidad del estudio de fosforilación de niveles de proteínas en ciertos tejidos. Las enzimas encargadas de este proceso, las quinasas y fosfatasas, son muy sensibles a la hipoxia, por lo que se desestima el uso de los sistemas convencionales de sacrificio como lo son el CO₂ y/o anestésicos. Se debe aclarar que, aunque en este trabajo no se presenten resultados derivados del estudio de las proteínas

fosforiladas anteriormente citadas, el diseño de los modelos animales también contempla ese tipo de estudios.

Se recolectó la sangre troncal con tubos impregnados de EDTA (*K2-ethylenediaminetetraacetic acid*) para centrifugarla inmediatamente y almacenar a -80 °C el plasma obtenido. Los tejidos fueron extraídos y congelados inmediatamente sobre hielo seco para mantenerlos luego a -80 °C hasta su análisis. Para el estudio histológico parte de esos tejidos fueron fijados en paraformaldehído 10 % para su posterior inclusión en parafina.

1.6 Criterios de punto final

La eutanasia de los animales también se ha realizado como método de punto final, para evitar un grado de sufrimiento superior al previsto. Los criterios de punto final fueron los siguientes:

- Cuando el animal presenta alteraciones metabólicas o sistémicas colaterales al ensayo que pueden desvirtuar totalmente los resultados.
- Cuando el animal sea incapaz de dar una respuesta fiable, debido al estrés o angustia colaterales al procedimiento.
- Cuando a consecuencia del estudio el animal sufra deterioro orgánico, el cual obligaría a terminar con el sufrimiento del animal.
- Cuando haya un sufrimiento innecesario o equivocado, inducido por el procedimiento y que no aportará datos fiables ni beneficiosos al proyecto.
- Cuando el sufrimiento pueda estar justificado, pero los resultados sean predecibles.
- Cuando los animales genéticamente modificados procedentes de la cría y reproducción no presenten el genotipo objeto del estudio.

2 Estudio de leche materna

En la presente tesis se han podido realizar estudios biomoleculares en leche materna gracias a la colaboración con el Banco de Leche Humana (BLH) del Hospital Clínico Universitario de Santiago, adscrito a la Unidad de Neonatología. El BLH de Santiago forma parte de las Intervenciones de Atención Primaria para la Prevención de Enfermedades Crónicas Materno-Infantiles de Origen Perinatal y del Desarrollo (RICORS), del Instituto de Salud Carlos III, y cuenta con la Acreditación Norma ISO 9001:2015. El uso de estas muestras para nuestra investigación está aprobado por el Comité de Ética de Investigación (CEI) bajo el título del proyecto “Biomarcadores de reprogramación metabólica asociados al efecto protector de la lactancia materna sobre la obesidad y patologías asociadas” y el código del protocolo PI22/00202.

Es el BLH la entidad encargada de captar donantes y formarlas para la adecuada extracción de la leche, además de proveer del material necesario, sacaleches, bolsas de recogida, gases estériles, nevera portátil, etc. Se recomienda a la donante almacenar la leche extraída hasta 24 h en el frigorífico, y posteriormente en el congelador, y no tardar más de 1 mes en trasladar esa leche al BLH. Al recibirla, el BLH debe asegurarse que se ha mantenido la cadena de frío, y almacenarlo a -22 °C.

En las bolsas de recogida la madre deberá apuntar el día en que se realizó esa extracción, y al entregar las bolsas en el BLH se identificará la madre con un código de donante, y todas las bolsas extraídas en el mismo día con un código de lote.

Cuando el BLH necesita utilizar la leche donada, procede a su descongelación a 4 °C. Previamente a la pasteurización que realizan para su uso alimentario se extrae una muestra para el laboratorio, donde la almacenamos a -80 °C en pequeñas alícuotas inmediatamente para su posterior análisis. Las muestras quedan identificadas por su número de entrada, y asociadas a

los códigos anonimizados de donante y de lote. A su vez, al código de lote quedan asociadas las fechas de extracción y de pasteurización. De esta manera se clasificarán las muestras conforme al momento de la lactancia en el que han sido extraídas;

- Calostro: 1 semana tras el parto
- Leche intermedia: 1 mes tras el parto
- Leche madura: más de 1 mes tras el parto

Para la presente tesis se han utilizado todas las muestras disponibles en el momento de su análisis.

3 Técnicas analíticas

3.1 Disección de áreas cerebrales

Tras el sacrificio de los animales, los cerebros se extrajeron y se congelaron inmediatamente en nieve carbónica sobre un papel de aluminio en de una superficie plana y colocados sobre el córtex, de esta manera nos aseguramos de mantener su estructura intacta. Una vez congelados se cierra el papel y posteriormente se almacenan a -80 °C.

Para la disección del LHA se utilizó una matriz cerebral (Tabla 22, Ref. 10). El cerebro se colocó sobre su superficie dorsal dentro de la matriz, generando una descongelación parcial con unas gotas de PBS. Una de las cuchillas se coloca justo sobre el comienzo de la eminencia media, identificable por encontrarse caudalmente al nervio óptico. Se posiciona la otra cuchilla a 2 mm en dirección caudal a la anterior. Se corta el cerebro y se coloca la loncha en una superficie plástica sobre de hielo. Con un bisturí y la ayuda de un atlas cerebral, se localiza el LHA y se aísla. El tejido se congela en tubos para su extracción proteica, que se explica a continuación.

3.2 Western Blot

Se utilizó la técnica semicuantitativa Western Blot para la comparación de niveles de ciertas proteínas en tejidos. Esta técnica incluye los siguientes pasos:

3.2.1 Extracción proteica

Se lisa química y mecánicamente un trozo de tejido congelado de alrededor de 50 mg. Para ello, se sumerge el tejido en tampón de lisis (Tabla 6) en tubos de 2 mL con cierre de seguridad y fondo redondo, añadiendo también una bola de metal en su interior. Se procede al homogeneizado mecánico de la muestra en el TissueLyser II (Tabla 22, Ref. 11) a 30 Hz 3 min para LHA y 5 min para el resto de los tejidos. Todo este proceso y el que sigue a continuación se realiza a 4 °C o en hielo.

Se centrifugan los homogeneizados a 14000 rpm 30 min para extraer el sobrenadante, correspondiente al extracto proteico. En el caso de trabajar con tejido graso se tuvo cuidado de evitar la capa grasa que se encuentra en el estrato superior, y además se realizaron varias centrifugaciones de 10 min para asegurarse de que la grasa había desaparecido visiblemente. El extracto proteico obtenido conserva a -80 °C para el momento de su uso.

Tabla 6: Componentes del tampón de lisis

Componente ¹	Concentración
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1 % (v/v)

Componente ¹	Concentración
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
EGTA	1 mM
Ortovanadato Sódico	1 mM
Fluoruro Sódico	50 mM
Pirofosfato Sódico	5 mM
Sacarosa	0.27 M
Fluoruro de fenilmetilsulfonio	1 mM
Cóctel de Inhibidores de proteasas ²	1 pastilla/50 mL

¹Disuelto en agua destilada

²Tabla 21, Ref. 7

3.2.2 Preparación de alícuotas de carga

La técnica de Western Blot parte de igual cantidad de proteína para todas las muestras, por ello se ha realizado una cuantificación de la proteína total contenida en los extractos y así poder preparar alícuotas con la misma cantidad de proteína.

Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de cuantificación utilizado (Tabla 21, Ref. 8), se generó una recta patrón mediante diluciones seriadas del estándar de proteína, de concentración conocida. Los extractos proteicos fueron diluidos en agua destilada para que su concentración estuviera dentro del rango de la recta, generalmente fue suficiente con una dilución 1/10 para LHA y 1/25 para el resto de los tejidos.

Las diluciones fueron mezcladas con los reactivos del kit en las proporciones indicadas en una placa de 96 pocillos (Tabla 22, Ref. 12), se dejaron incubar 15 min y se realizó una lectura a 750 nm en el espectrofotómetro (Tabla 22, Ref. 13). Después de restar a todas las mediciones el blanco (agua destilada o solución de lisis), las concentraciones de las muestras fueron obtenidas a través de la ecuación de la recta patrón obtenida.

Finalmente, se prepararon alícuotas de igual volumen e igual cantidad de proteína para todas las muestras que fueran a ser cargadas en el mismo gel. Estos parámetros fueron dependientes del tamaño del pocillo y de la concentración de la proteína de interés en el tejido a estudiar, variando de 15 a 25 uL, y de 8 a 20 ug.

Cada alícuota de carga contenía el volumen de extracto proteico que aportaba la cantidad necesaria de proteínas totales, un tampón de carga 5 veces concentrado (Tabla 7) y agua destilada o solución de lisis para completar el volumen determinado. El volumen para añadir de tampón de carga estaba determinado por el volumen final de la alícuota, siendo necesario que quedara 5 veces diluido (5 uL de tampón para una alícuota de 25 uL). La función de este tampón es la de desnaturalizar las proteínas eliminando sus puentes disulfuro, dotar de carga negativa a todas las proteínas proporcionalmente a su tamaño, aumentar la densidad de la muestra para que no se diluya en la solución de electroforesis y permitir la identificación del frente de migración.

Una vez preparadas las alícuotas de carga, se congelaron a -20 °C o -80 °C para ser utilizadas en la electroforesis los días siguientes.

Tabla 7: Composición del tampón de carga 5x

Componente ¹	Concentración
Tris-HCL pH 6,8 1M	40 % (v/v)
SDS	1 % (m/v)
Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,5 % (v/v)

Componente ¹	Concentración
Tris-HCL pH 6,8 1M	40 % (v/v)
SDS	1 % (m/v)
β -mercaptoetanol	5 % (v/v)

¹Disuelto en agua destilada

3.2.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para separar las proteínas de las muestras por masa molecular se utilizó la técnica de electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Los geles son estructuras tridimensionales basados en la polimerización de la poliacrilamida, reacción catalizada por el persulfato amónico (APS) y el tetrametiletilendiamina (TEMED). La concentración de acrilamida fue elegida según el tamaño de la proteína a estudiar en cada experimento, teniendo en cuenta que más proporción significa un gel más compacto donde se separan mejor las proteínas de menor peso molecular (20/50 kDa), y menor proporción las de mayor peso.

Se utilizaron dos tipos de geles dependiendo de la cantidad de muestras a incluir en un solo experimento; geles comerciales (Tabla 22, Ref. 14) y geles preparados en el laboratorio. Estos últimos se componen de dos partes, una parte baja separadora, y una superior concentradora (Tabla 8 y Tabla 9). Entre los cristales separadores se dejó polimerizar primero la separadora, y más tarde la concentradora, encajando en la parte superior un peine que genera unas hendiduras en el gel en forma de pocillos donde se añadirá cada una de las muestras.

Tabla 8: Composición de los geles separadores (10 mL)

Componente	Concentración Acrilamida	
	10 %	12 %
Agua destilada	4 mL	3,3 mL
Acrilamida-BIS 30 % ¹	3,3 mL	4 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 ¹	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10 % ¹	0,1 mL	0,1 mL
APS 10 % ¹	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

¹En agua destilada

Tabla 9: Composición del gel concentrador (3 mL)

Componente	Volumen
Agua destilada	2,1 mL
Acrilamida-BIS 30 % ¹	0,5 mL
Tris-HCL 1,5 M pH 6,8 ¹	0,38 mL
SDS 10 % ¹	0,03 mL
APS 10 % ¹	0,03 mL
TEMED	0,003 mL

¹En agua destilada

Tras dejar el tiempo necesario para la polimerización, se retiraron los peines de los geles y se montaron en una cubeta de electroforesis correspondiente a su tamaño cubriéndolos con un tampón de electroforesis que permite la transmisión del voltaje.

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis

Componente ¹	Concentración
Tris	3 g/L
Glicina	14.4 g/L
SDS	0.1 % (p/v)

¹Diluido en agua destilada

Se hirvieron las alícuotas en un baño seco a 95 °C 5 min, para completar la desnaturalización. Se diluyeron 5 uL del marcador de pesos moleculares (Tabla 21, Ref. 9) en suficiente volumen de tampón de carga no concentrado para igualar el volumen de las muestras, y se cargó en el primer pocillo del gel, seguido del resto de muestras. Se tuvo en cuenta que en cada gel deben estar representados todos los grupos experimentales, dejando también constancia de en qué orden se cargan las muestras.

Se conectó la cubeta a una fuente de alimentación para generar un voltaje constante de 60 mV hasta que el frente superara la parte del gel concentradora, y aumentando después a 120 mV. Se dio por finalizada la electroforesis cuando el marcador estuviera en la posición deseada.

3.2.4 Transferencia

Una vez que las proteínas de cada muestra están distribuidas a lo largo del gel según su peso molecular, se transfirieron a una membrana para poder someterlas al proceso de inmunodetección. En este caso se utilizó un tipo de transferencia semiseca.

Se colocaron en el equipo de transferencia (Tabla 22, Ref. 15) en el orden indicado por el proveedor los papeles de transferencia (Tabla 22, Ref. 16), el gel, y la membrana (Tabla 22, Ref. 17), todo humedecido con el buffer de transferencia (Tabla 11).

Tabla 11: Tampón de transferencia

Componente ¹	Concentración
Tris	5.8 g/L
Glicina	29.2 g/L
SDS	0.36 g/L
Metanol	20 % (v/v)

¹Diluido en agua destilada

Las condiciones para el proceso de transferencia fueron de 0.8 mA/cm² de membrana constantes, durante 1 hora y 40 minutos.

3.2.5 Inmunodetección

Las membranas fueron incubadas con suero de albúmina bovino (BSA) (Tabla 21, Ref. 10) al 5 % en tampón de lavado (Tabla 12) durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear posibles uniones inespecíficas del anticuerpo a zonas de la membrana libres de proteínas.

Tabla 12. Tampón de lavado (PBST)

Componente ¹	Concentración
Solución salina tamponada ²	10 g/L
TWEEN® 20 ³	0.1 % (v/v)

¹Diluido en agua destilada

²Tabla 21, Ref. 11

³Tabla 21, Ref. 12

Tras el bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo específico contra la proteína a detectar (Tabla 13), diluido en solución de bloqueo. La concentración de los distintos varió entre 1/500 y 1/1000 dependiendo de las indicaciones del fabricante y las pruebas internas en el laboratorio.

Al día siguiente se retira el anticuerpo y se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST a temperatura ambiente y agitación. En las mismas condiciones se incubó durante 1h con un anticuerpo secundario unido a la enzima peroxidasa. Además, este anticuerpo fue específico para detectar anticuerpos primarios del origen que se haya utilizado (conejo o ratón). En este caso las diluciones fueron de 1:10000 para el anticuerpo anti-ratón (Tabla 13, Ref. 7) y 1:5000 para el anticuerpo anti-conejo (Tabla 13, Ref. 8).

Tabla 13: Referencias de anticuerpos

	Objetivo	Casa comercial	Referencia
Ref. 1	β -ACTIN	Sigma-Aldrich	A5316
Ref. 2	ANGPTL4	Invitrogen	40-9800
Ref. 3	LPL	Santa Cruz	sc-32885
Ref. 4	KLF15	ThermoFisher	PA5-28133
Ref. 6	FGF21	Abcam	ab64857
Ref. 7	Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	JAC-115-035-003
Ref. 8	Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	JAC-111-035-003

Terminada la incubación con el anticuerpo secundario, se vuelven a realizar los lavados en las mismas condiciones que los anteriores. Posteriormente se incubó la membrana con una mezcla a partes iguales del sustrato de la peroxidasa y el potenciador de la quimioluminiscencia (Tabla 21, Ref. 13) durante 5 minutos en oscuridad, para inmediatamente colocarlas en el lector (Tabla 22, Ref. 18) y comenzar con el revelado.

Para poder revelar varias proteínas en la misma membrana, indispensable para poder analizar la proteína control que en este caso fue la β -actina (Tabla 13, Ref. 1), se utilizaron diferentes técnicas de estriado. Una de ellas es una técnica más suave que rompe la unión entre el anticuerpo primario y secundario; se realizó incubando la membrana 1 hora a temperatura ambiente en una solución de BSA 5 % en PBST y azida sódica (Tabla 21, Ref. 14) al 1 %. Después de 3 lavados de 15 minutos con PBST se procedió al incubado nocturno con el siguiente anticuerpo primario. Sin embargo, esta técnica no es útil cuando ambos anticuerpos primarios son del mismo origen, en cuyo caso se utilizó una técnica más enérgica, un incubado a 50 °C 45 minutos en agitación con tampón de estriado (Tabla 14) corrigiendo el pH a 6.7 con HCL.

Tabla 14: Tampón de estriado¹

Componente ²	Concentración
Tris	1 % (p/v)
SDS	2 % (p/v)
β -mercaptoetanol	0,7 % (v/v)

¹pH 6.7

²Diluido en agua destilada

Tras esta técnica se realizaron numerosos lavados con abundante PBST para eliminar del todo el β -mercaptoetanol, y se volvió a bloquear la membrana con BSA al 5 % en PBST. Tras este proceso se reincubó la membrana con el siguiente anticuerpo primario.

3.2.6 Análisis

Una vez revelada la proteína de interés y el control de carga se procedió a la cuantificación de la densidad óptica de la señal quimioluminiscente correspondiente a cada muestra. Para ello se utilizó el software Image J (Tabla 23, Ref. 2), se invirtió el color de la imagen y se eligió un área de medición constante para todas las muestras, a este valor se le restó la densidad óptica propia del fondo de la membrana, en una región adyacente a la señal de la muestra. La intensidad de la señal de la proteína de interés en una muestra se corrigió por la intensidad del control de carga correspondiente a esa misma muestra, y los datos resultantes fueron normalizados y en porcentaje respecto al grupo control del experimento.

3.3 Secuenciación de ARN

Se realizó un estudio de secuenciación del transcriptoma entero (RNA-seq) de muestras congeladas de tejido hepático para conocer los posibles cambios en la expresión génica que podría producir la lactancia prolongada. Para ello, se escogieron aleatoriamente 3 ratas de cada grupo de estudio (Lactancia Estándar y Dieta alta en Grasa y Lactancia Prolongada y Dieta alta en Grasa).

3.3.1 Extracción de ARN

Se comenzó cortando un trozo de tejido de entre 20 y 40 mg y añadiéndole 300 uL de TRIzol™ (Tabla 21, Ref. 15) para el aislamiento de los ácidos nucleicos. La muestra fue homogeneizada mecánicamente resuspendiéndola con agujas consecutivamente más finas (16 G, 18 G y 21 G). A continuación, se realizó una centrifugación de 5 min a 12000 g a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente.

En este punto, se comenzó con la extracción de ARN. Se añadieron 60 uL de cloroformo y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 15 min a 12000 g y 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 10 ug de glucógeno libre de ARNasas (Tabla 21, Ref. 16), un portador inerte que mejorará la precipitación de ácidos nucleicos, y 150 uL de isopropanol 100 %. Se vorteoó la mezcla y se incubó la a 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó 10 min a 12000 g y 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 300 uL de etanol 75 %. Tras vortear nuevamente la mezcla se centrifugó 5 min a 7500 g y 4 °C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50 uL de agua libre de nucleasas.

La calidad del ARN se determinó mediante el kit de ensayo IQ de ARN Qubit™ (Tabla 21, Ref. 17), siguiendo las indicaciones del fabricante, y mediante un gel 1 % de agarosa preparado en TBE 0.5X preparado en agua libre de ARNasas o DEPC. La carcasa para correr el gel se limpió previamente con descontaminante (Tabla 21, Ref 18) para eliminar ARNasas. Se cargó 1 µg de cada muestra de ARN preparada con colorante de carga de gel de ARN 2X (Tabla 21, Ref. 19). El gel se corrió durante 16 min a 180 V. El patrón de bandas se analizó usando el BioRad Gel Doc™ XR+ system (Tabla 22, Ref. 19).

3.3.2 Secuenciación y análisis

Una vez comprobada que la calidad del ARN es la adecuada se enviaron las muestras a la compañía Novogene. El ARN fue ribodeplecionado, quedando en la muestra ARN mensajero y ARN no codificante. Se procedió a la fragmentación del ARN, y con la adicción de cebadores aleatorios a la transcripción reversa para formar fragmentos de ADN complementario de dos hebras. A continuación, se añadieron los adaptadores necesarios a cada secuencia de ADN,

generando así la librería que posteriormente fue secuenciada mediante el método de extremos pareados utilizando la plataforma Illumina HiSeq4000, con longitudes de lectura de 150 pb.

Tras recibir los datos en crudo de la secuenciación, el control de calidad se realizó utilizando fastqc (v0.11.9). Posteriormente, las lecturas sin procesar se alinearon con el genoma rn6 (UCSC) utilizando STAR (2.7.10b) con parámetros predeterminados, y las alineaciones resultantes se ordenaron por coordenadas usando la opción “--outSAMtype BAM SortedByCoordinate”. La cuantificación de la alineación de lectura con los genes se realizó utilizando el recuento HTSeq (v2.0.4). El análisis se realizó utilizando el modo de intersección no vacía (“-m intersección-no vacía”), con la hebra definida en no (“-s no”) y el orden establecido en posición (“-r pos”). El análisis de expresión genética diferencial se realizó en las lecturas sin procesar utilizando DESeq2 (1.42.0), que aplica una distribución binomial negativa diferencial para la significación estadística. Los datos en bruto se filtraron primeramente para realizar el análisis solamente de aquellos genes que tuvieran por lo menos una lectura del gen en una de las muestras. Se consideró como diferencia de expresión significativa cuando el valor p ajustado fue menor a 0.05. Los archivos TDF para visualización IGV se generaron usando igvtools (v2.4.19) con los parámetros “-z 7 -f media”.

Antes de comenzar las comparaciones entre los grupos, se realizó un análisis exploratorio para conocer similitudes entre las muestras. Para ello se generó un análisis de componentes principales (APC) en el software R 4.3.1 con el paquete factorextra. Se trata de un método de reducción lineal de la dimensión no supervisado. Se agrupan los genes fuertemente correlacionados en una sola variable, eliminando redundancia, y se representa solo aquellas variables que expliquen mejor la mayor parte de los datos. Para realizarlo se utilizaron las lecturas normalizadas y transformadas mediante el log2, para favorecer su visualización y comparación.

También en R se generó un diagrama de dispersión tipo *volcano plot* para relacionar el cambio de expresión de cada gen entre los grupos con su significancia estadística, y un mapa de calor o *heatmap* utilizando el paquete heatmaply para visualizar la magnitud de la expresión génica en cada muestra donde tanto los grupos como los genes están *clusterizados* mediante su distancia euclídea. Para cuantificar el cambio de expresión se ha utilizado el log2 del *fold change* (FC), esta medida se obtiene al dividir, para cada gen, la media de expresión en el grupo de lactancia prolongada entre la media en el grupo de lactancia estándar. De esta forma un FC de 1 significa un aumento del doble de expresión del grupo de lactancia prolongada con respecto al de lactancia estándar, y un FC de -1 una disminución de la mitad de la expresión.

Se analizó también la interacción entre los genes significativos utilizando la base de datos STRING. Esta base de datos contiene información sobre las interacciones físicas o funciones conocidas y predichas entre proteínas. Mediante el paquete rbiapi y usando como entrada la lista de genes significativos, se obtuvo la red de interacción de sus proteínas correspondiente considerando interacciones de una fortaleza moderada a alta (score de interacción > 0.5). Adicionalmente, se determinó si la cantidad y fortaleza de las interacciones de la red obtenida era mayor a la esperada por el azar, es decir, a la esperada si las proteínas fuesen aleatorias. Finalmente, para cada par de interacción se determinaron los componentes del score general en función de los distintos tipos de evidencia que respaldaban dicha interacción, por ejemplo, evidencias de coexpresión, de perfil filogenético o experimentales, entre otras.

Para terminar, se ha realizado un análisis funcional de los genes que se encontraron modificados. Con el paquete de R clusterProfiler se realizó un análisis de sobrerrepresentación (ORA) utilizando el recurso de ontología génica (GO). GO es una base de datos que describe el gen y su producto génico al especificar el proceso biológico del que forma parte, su localización en la célula, y su función molecular. En este caso el análisis fue realizado

atendiendo únicamente al proceso biológico, sabiendo que hace referencia a funciones más relevantes del organismo. Para acceder a las anotaciones de GO se utilizó el paquete de anotación biológica org.Rn.eg.db, que contiene información sobre genes de la rata (*Rattus Norvegicus*).

Por su parte, el ORA consiste en determinar el enriquecimiento o sobrerepresentación de un grupo de genes que están relacionados con una función concreta en la lista de genes modificados por lactancia prolongada. Para ello, usando la base de datos de GO (acceso Julio 2024), se identificó para cada una de las funciones y sus genes relacionados aquellos que se encontraban en la lista de genes significativos para la comparación de estudio y aquellos que no se encontraban en ella. Para determinar si hay sobrerepresentación de genes significativos para una determinada función, se utilizó el test hipergeométrico. Dado que hay múltiples funciones y para cada una de ellas se realiza un test, se utilizó el método de Benjamin-Hochberg para ajustar los valores p por comparaciones múltiples usando como umbral de significación 0.05. Se usó como lista de genes de referencia, o universo genómico todos los genes identificados en el análisis RNA-seq.

Para la representación de los análisis de funcionalidad se utilizaron distintos gráficos generados con el paquete de R enrichplot. Se realizaron diagramas de puntos para representar del número de genes asociados a ciertos términos, su valor p ajustado asociado y la ratio de genes (genes modificados que pertenecen a esa función / todos los genes modificados e identificados). Además, para dar cobertura a las posibles complejidades biológicas por las cuales un gen puede pertenecer a varias anotaciones se realizaron gráficos tipo red, donde se representan los vínculos entre genes y términos. Esta asociación también se representa en el mapa térmico, donde es más sencillo localizar patrones de expresión. Para terminar, se generó un dendrograma que se basa en las similitudes por pares de los términos más enriquecidos, calculadas por el índice de similitud de Jaccard, con este método se generan agrupaciones semánticas que reducen términos redundantes.

3.4 Análisis de ARN mensajero por PCR a tiempo real

3.4.1 Extracción de ARN

Se cortó un trozo de aproximadamente 0.1g del tejido objeto de análisis congelado y se añadió a 750 uL de Trizol™ (Tabla 21, Ref. 15). Se procedió a su lisado utilizando una bola de acero y dejándolo 3 min a 30 Hz en el aparato lisador (Tabla 22, Ref. 11) manteniendo la muestra siempre en frío. Se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. A continuación, se añadieron 150 ul de cloroformo y se mezcló por inversión, se dejó reposar a temperatura ambiente 5 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Este proceso provoca una inversión de fases, quedando la acuosa junto con el ARN en la parte superior y la orgánica con proteínas y lípidos en la parte inferior. Se recogió el máximo volumen posible de la fase acuosa, evitando absorber la parte orgánica. A continuación, se añadió la misma cantidad de etanol 70 % que de fase acuosa recogida por cada muestra, se mezcló por inversión y se llevó la muestra columna de filtración (Tabla 21, Ref. 20). A partir de este punto, se siguieron las instrucciones del kit, realizando una serie de lavados y centrifugaciones para terminar diluyendo la muestra en agua DEPC y guardándola a -20 °C para su posterior análisis.

3.4.2 PCR a tiempo real

El primer paso fue la cuantificación del ARN en el Nanodrop (Tabla 22, Ref. 20), comprobando también posibles contaminaciones y corrigiendo la concentración o descartando

si estas existieran. Se prepararon alícuotas a una concentración de 10 ng/uL de ARN diluyendo la muestra en agua DEPC.

Se utilizó un kit de PCR de un solo paso (Tabla 21, Ref. 21), que incluye tanto la enzima retrotranscriptasa como la polimerasa en una misma mezcla, y cuantifica el ADN con el colorante SYBR Green. Los cebadores utilizados están indicados en la Tabla 15. Previamente a la PCR se mezclaron los cebadores directo y reverso de cada gen en una dilución 10 uM para cada uno en agua DEPC. El resto de los componentes de la mezcla se indican en la Tabla 16 indicando su volumen por cada pocillo, generando un volumen total de reacción de 10 ul.

Tabla 15: Cebadores utilizados en la PCR

Gen	Cebador	Secuencia
<i>Angptl4</i>	Directo	CTGGGTGCCACCAATGTTTC
	Reverso	CTCCATGGGCTGGATCAACA
<i>Hprt</i>	Directo	CTGAAGAGCTACTGTAATGACCA
	Reverso	CGCTGACAAACATGATTC
<i>Klf15</i>	Directo	AAGTTCCCCAAGAACCCAGC
	Reverso	AAGTTCCCCAAGAACCCAGC
<i>Banp</i>	Directo	AACACCACGAGAATTCCGCA
	Reverso	CCCAGGAACAGCGTTGCTAA

Tabla 16: Componentes de la PCR

Componente	Volumen ¹
One-step NZYSpeedy qPCR Green master mix (2x), ROX plus	5 uL
Mezcla de cebadores	0.8 uL
NZYRT mix	0.4 uL
Muestra	2 uL
Agua DEPC	1.8 uL

¹Por pocillo

Las condiciones de PCR fueron las indicadas en la Tabla 17. Se hicieron duplicados para la medición de cada gen y muestra, incluyendo en cada PCR muestras de cada uno de los grupos experimentales, junto con el gen de expresión constitutiva, que en este caso fue el gen *Hprt*. Además, se incluyeron controles negativos, que en lugar de muestra contenían agua, y una curva estándar de concentración utilizando diluciones seriadas de la mezcla de todas las muestras incluidas en esa PCR, asignándole a cada punto su factor de dilución relativo (1 para muestra si diluir, 0.5 para muestra diluida 1/2).

Tabla 17: Condiciones de PCR

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Reacción
1	50 °C	15 min	Reversotranscripción
1	95 °C	2 min 30 s	Activación de la polimerasa
40	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	40 s	Anillamiento y extensión

La placa de PCR cargada fue analizada en el QuantStudio (Tabla 22, Ref. 21) utilizando el software propio de la marca comercial. Para determinar la cantidad de ARN relativa de las muestras la aplicación calcula automáticamente el umbral de ciclos, es decir, el nivel de la señal

fluorescente que representa un incremento estadísticamente significativo respecto al nivel basal. El número de ciclo que provoca ese aumento se conoce como el Ct. Los duplicados que diferían en uno o más Ct fueron descartados.

Los resultados se representaron como una cantidad relativa, producto de la interpolación del Ct en la curva estándar, y corregidos por la cantidad relativa del gen de expresión constitutiva.

3.5 Determinaciones plasmáticas

Se realizaron mediciones de triglicéridos y ácidos grasos libres (NEFAS) en plasma a través de kits comerciales específicos, mostrados en la Tabla 18, Ref. 1 y 2 respectivamente. Se siguieron los protocolos aportados por el fabricante. Este tipo de análisis se fundamentan en una reacción enzimática colorimétrica que es evaluada con un espectrofotómetro (Tabla 22, Ref. 11) a una longitud de onda concreta.

Se realizó un análisis de la concentración de ANGPTL4 en plasma mediante un ELISA (Tabla 18, Ref. 3). En este ensayo inmunoenzimático la proteína es localizada con un anticuerpo y la concentración de ese anticuerpo se mide con una enzima asociada, también en el espectrofotómetro y a la longitud de onda indicada por la casa comercial.

Todas estas mediciones se basan en una extrapolación a una recta de calibrado. Cuando fue necesario se realizaron pruebas con diferentes diluciones de la muestra plasmática para que la concentración estuviera siempre dentro de la recta y de los límites de medida establecidos por el protocolo.

Tabla 18: Kits comerciales para mediciones plasmáticas

Referencia	Producto	Casa comercial	Referencia
Ref. 1	TRIGLYCERIDES -LQ	Spinreact	GPO-POD. Líquido
Ref. 2	NEFA-HR	Wako	91898
Ref. 3	Rat Angiopoietin Like Protein 4 Elisa Kit	Shanghai BlueGene Biotech	E02A0507

3.6 Proteómica

La proteómica es definida como la ciencia que estudia el proteoma, es decir, el conjunto de proteínas presentes en un sistema biológico (células, tejidos, órganos, etc.) en un estado de diferenciación, desarrollo y/o condiciones ambientales determinadas.

En esta tesis, se realizó un estudio proteómico cuantitativo con la ayuda de la plataforma de proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, liderada por la Dra. Susana B. Bravo López. Se siguió un flujo de trabajo conocido como *top-down*, caracterizado por el análisis de fragmentos peptídicos en lugar de las proteínas intactas.

El objetivo fue determinar la abundancia de las proteínas presentes en las muestras, y compararlas entre ellas. Se escogieron aleatoriamente cuatro muestras de plasma de rata del modelo de lactancia prolongada de cada grupo de interés; lactancia estándar con dieta alta en grasa y lactancia prolongada con dieta alta en grasa.

3.6.1 Preparación de la muestra

Inmediatamente tras el sacrificio de los animales y la recolección de la sangre, esta se sometió a una centrifuga a 3500 rpm a 4 °C durante 15 minutos, se recogió el plasma y se guardó a -80 °C para su posterior análisis.

Para el análisis proteómico, se realizó una depleción de proteínas mayoritarias del plasma, ya que rebajan la eficiencia de ionización en el análisis de espectrometría de masas, interfiriendo con la cuantificación de proteínas menos concentradas. Para ello se prepara dithiotreitol (DTT) fresco a 500 mM y se añade a cada alícuota de 30 µl de suero humano 3.33

μl y se vortea vigorosamente. A continuación, las muestras se incuban 1h hasta que se observa un precipitado blanco. Se centrifugan a 14000 g durante 20 min, se recoge el sobrenadante en un tubo limpio y se almacena a -20 °C hasta su uso.

3.6.2 Preconcentración y digestión

Se realiza una electroforesis para concentrar las muestras en una única banda de entre 3 y 4 mm de grosor, justo después del gel concentrador. Primeramente, se prepararon alícuotas de 30 uL de muestra diluida en tampón de carga (Tabla 19) y se hierve durante 5 minutos.

Tabla 19: Composición del tampón de carga

Componente ¹	Concentración
Tris-Base 0.5M pH 6.8	25 % (v/v)
SDS	20 % (p/v)
Glicerol	0,2 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,001 % (v/v)
β-mercaptoetanol	0,2 % (v/v)

¹Disuelto en agua destilada

Se prepararon geles al 10 % de acrilamida como indica la Tabla 20, y se realizó la electroforesis utilizando el tampón de carga indicado en la Tabla 10, a una intensidad constante de 40 A. Una vez el frente de migración penetró aproximadamente 3 o 4 mm en el gel separador, se detiene la electroforesis y utiliza el reactivo QC-Colloidal Coomassie (Tabla 21, Ref. 22) siguiendo las instrucciones del fabricante para teñir los geles mediante el protocolo de máxima sensibilidad. En este punto se cortaron con bisturí las bandas concentradas de las muestras.

Tabla 20: Composición del gel de acrilamida

Componente ¹	Concentración
Acrilamida	10 % (p/v)
Tris-Base 1.5M pH 8.8	25 % (v/v)
APS	10 % (v/v)
TEMED	1 % (v/v)

¹Disuelto en agua destilada

El siguiente paso fue la digestión proteica *In-Gel*. Se lavaron los fragmentos de gel 3 veces con una disolución de bicarbonato de amonio (Ambic) 50 mM y metanol 50 % (v/v) mediante agitación durante 10 minutos para eliminar el colorante azul. Se deshidrataron las proteínas con acetonitrilo (ACN) y se secaron al vacío usando el equipo SpeedVac (Tabla 22, Ref.22). A continuación, se redujeron las proteínas con DTT 50 mM diluido en Ambic 10mM durante 30 minutos a 56 °C en agitación. Se repitieron los lavados, el secado y la reducción y se procedió a la alquilación de los grupos tiol libres con IAA 55 mM en Ambic 50 mM 20 minutos en oscuridad. Se volvió a lavar y secar la muestra, y se añadió tripsina a 20 ng/ul en Ambic 20 mM. Se añadió a las muestras el doble de solución de Ambic 20 mM y se incubaron una noche a 37 °C en agitación.

La extracción de los péptidos se realizó al siguiente día, haciendo 3 incubaciones de 20 minutos con ACN al 60 % y ácido fórmico al 0.5 % en agitación. Se recogió el sobrenadante, donde se encuentra la fase peptídica, y se secó a vacío durante 2 h para congelarlo a -20 °C hasta su uso.

3.6.3 Cromatografía líquida

Para la identificación de las proteínas primeramente se separaron los péptidos digeridos usando una cromatografía líquida (LC) de fase reversa utilizando el sistema Eksigent Technologies nanoLC 400 Sciex.

La LC separa los péptidos por su nivel hidrofóbico. Los fragmentos peptídicos son transportados en una fase móvil acuosa a través del sistema, al llegar a la columna (fase estacionaria), se genera un gradiente reduciendo la fase móvil acuosa e incrementando la fase móvil orgánica durante 40 minutos. La diferente afinidad de los péptidos con la fase estacionaria y móvil orgánica los hará avanzar con distinta velocidad, por lo que el tiempo de elución será distinto y saldrán del sistema a diferentes tiempos.

Las mezclas de péptidos se diluyeron en 30 uL de ácido fórmico 0,1 % en agua con ayuda de sonicación. Se inyectaron 4 uL (4 ug de muestra) en una columna de fase reversa a base de sílice (Tabla 22, Ref. 23). La anterior dilución se utilizó también como fase móvil acuosa, y el ácido fórmico 0,1 % diluido en ACN como orgánica. Los péptidos más hidrofílicos salen con un 2 % de fase orgánica, y cuando el gradiente se vaya incrementando hasta 98 % saldrán los más hidrofóbicos.

3.6.4 Análisis Cuantitativo (SWATH™)

Acoplado al cromatógrafo se utilizó un espectrómetro de masas (Triple TOF 6600). Dado que los fragmentos peptídicos de los que se parte son sometidos a varios análisis consecutivos por parte del espectrómetro de masas (MS), se habla de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El conjunto del acoplamiento de una cromatografía a un espectrómetro de masas, así como el uso de este repetidamente hacen que la técnica se conozca por las siglas LC-MS/MS.

Un espectrómetro de masas mide la masa y carga de las moléculas para su identificación. Brevemente, ioniza los péptidos, los acelera, los desvía con un imán para separarlos y así medir la intensidad de los iones por separado. Debido a que tanto la carga como la masa de los péptidos modificará su respuesta al imán de forma distinta, las unidades de masa/carga (m/z) resultantes servirán para identificar de qué péptido se trata, y así poder cuantificar su presencia en la muestra.

Inicialmente, se construyó una librería espectral utilizando la adquisición dependiente de datos (DDA). Para ello, se analizó una mezcla (pool) de muestras de un mismo grupo experimental, permitiendo identificar los péptidos más abundantes. Este enfoque implica la separación de los péptidos mediante cromatografía líquida (LC) y un análisis mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En este proceso, los iones de los péptidos son seleccionados en función de su abundancia relativa, generándose un espectro que luego sirve para la identificación de los péptidos presentes en las muestras.

Posteriormente se reanalizaron cada una de las muestras a través de la adquisición independiente de datos (IDA). De nuevo las muestras, ahora por separado, pasan por una LC para separar los péptidos por tamaño, y un por un primer MS que genera un espectro de los péptidos presentes en la muestra, separados por su relación m/z . Al contrario que en el DDA, el IDA no se seleccionan los péptidos más abundantes para la segunda MS, si no que se analizan todos los péptidos y se refragmentan. Para analizar los datos obtenidos se utilizó el método SWATH-MS (IDA) (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) con 100 ventanas utilizando el programa PeakView™ (Tabla 23, Ref. 2). Estas ventanas se corresponden con rangos de tiempo del experimento (hasta los 40 min) en los que se calcula, utilizando los datos obtenidos en el MS1. Los péptidos refragmentados pasan de nuevo por una segunda MS, y cada ventana se analiza de forma independiente, programando al espectrómetro para medir los péptidos de la librería espectral.

De esta forma el DDA permitió construir la librería espectral a partir de los péptidos más abundantes, mientras que el enfoque IDA (SWATH-MS), facilitó un análisis exhaustivo e independiente de todos los péptidos presentes en las muestras, brindando tanto su identificación como cuantificación.

3.6.5 Análisis bioinformático

La identificación de las proteínas y fragmentos peptídicos se realizó con ProteinPilot™ usando los algoritmos Paragon™ y Progroup™ utilizando los resultados de los *pools* de muestras. La tasa de falsos positivos (FDR) para la identificación de proteínas fue ajustado al 1 %.

En la realización de la librería espectral sólo se incluyeron los péptidos con un valor de confianza superior al 99 %. Tras realizar el análisis IDA, se extraen las áreas necesarias para la cuantificación de los péptidos. Se determinó que para que una proteína fuera identificada se debían encontrar 10 péptidos por proteína y 7 transiciones por péptido. Una vez extraídas las áreas de cada péptido, se utilizó el programa MarkerView™ para su análisis. Se normalizaron las áreas por su sumatorio total y se compararon las medias de los grupos mediante la prueba t de Student, considerando significativos los resultados con un nivel de confianza superior al 95 %.

Finalmente, se realizaron las representaciones de datos igual que en el caso del RNA-seq, un diagrama de dispersión, un APC y un mapa de calor. También se analizó la interacción entre las proteínas significativas y sus funciones asociadas mediante la técnica ya explicada (pág. 50).

3.7 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos y gráficos de esta tesis, exceptuando los apartados dónde se especifica un análisis distinto, han sido realizados mediante el software GraphPad Prism 8.0.2 (Tabla 23, Ref 4). Los datos aparecen expresados como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). El tamaño muestral de los grupos experimentales aparece especificado en los pies de Figura. Se han excluido valores procedentes de animales que presentaran un comportamiento anormal o de resultados que mostraran indicios de errores técnicos. También se ha valorado la exclusión de valores identificados como valores atípicos mediante el método de ROUT (Robust regression and Outlier removal). Este método ajusta una curva que sufre pocas influencias por outliers mediante un método de regresión no lineal robusto, los residuos son analizados para identificar los outliers utilizando el FDR para testar comparaciones múltiples, considerando un valor FDR por debajo del 1 % como un outlier.

La normalidad de la distribución de los datos ha sido realizada mediante la prueba de Shapiro-Wilk, teniendo en cuenta que en ningún caso se ha superado un tamaño de muestra de 50. La homogeneidad de las varianzas fue testada mediante el test F. Con estos resultados se procedió a realizar el test correspondiente:

- Test T de student con datos normales y varianzas homogéneas para comparar las medias de dos poblaciones desapareadas.
- ANOVA con datos normales y varianzas homogéneas para determinar si había diferencia entre las medias de tres o más grupos experimentales. Añadido a esta prueba, se realizó un test de Tukey para comparar grupo a grupo.
- Test Mann-Whitney con datos no normales o varianzas no homogéneas, para comparar la mediana de dos poblaciones desapareadas
- Test Kruskal-Wallis con datos no normales o varianzas no homogéneas para encontrar diferencias entre las medianas de tres o más grupos experimentales. Añadido a esta prueba se realizó un test de comparaciones múltiples de Dunn.

En todos los análisis, se consideran significativos con una probabilidad de error menor de 0,05(*), 0,01(**) o 0,001(***)).

4 Referencias comerciales

Tabla 21. Referencias de reactivos y péptidos

Referencia	Producto	Casa comercial	Referencia
Ref. 1	Ketamina Imalgene 100 mg/mL solución inyectable	Merial	2529 ESP
Ref. 2	Xilacina Rompun 2 %	Bayer Health Care	1967 ESP
Ref. 3	FGF 21 Human	Prospect	CYT-474
Ref. 4	Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet	Inotiv	2918
Ref. 5	Rodent Diet With 45 kcal % Fat	Research Diets	D12451
Ref. 6	SuperGlue-3	Loctite	2640076 es-ES
Ref. 7	cOmplete™ Cóctel de inhibidores de proteasas	Merck	11697498001
Ref. 8	RC DC Protein Assay	Bio-Rad	5000122
Ref. 9	Precision Plus Protein Standards-Dual Color	Bio-Rad	1610394
Ref. 10	Bovine Serum Albumin heat shock fraction, pH 7, ≥98 %	Merck	A7906
Ref. 11	Disolución salina tamponada con fosfato	Merck	P3813
Ref. 12	TWEEN® 20	Merck	P2287
Ref. 13	Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad	1705061
Ref. 14	Azida Sódica	Sigma-Aldrich	9036-19-5
Ref. 15	TRIzol™ Reagent	Invitrogen	15596026
Ref. 16	Glycogen, molecular biology grade	Thermo Scientific	R0561
Ref. 17	Kits de ensayo IQ de ARN Qubit™	Thermo Scientific	Q33221
Ref. 18	Descontaminante de superficies Molecular BioProducts™ RNase™ AWAY	Thermo Scientific;	7000TS1
Ref. 19	Colorante de carga de gel de ARN (2X)	Thermo Scientific;	R0641
Ref. 20	E.Z.N.A.® Total RNA Kit I	Omega Bio-tek	R6834-00S
Ref. 21	One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green kit, ROX plus	Omega Bio-tek	MB34401
Ref. 22	QC Colloidal Coomassie Stain	Bio-Rad	#1610803

Tabla 22. Referencias de material y equipos

	Producto	Casa comercial	Referencia/modelo
Ref. 1	Body Composition Analyzer	EchoMRI™	EchoMRI™-500
Ref. 2	Compact-Infrared-Thermal Imaging-Camera	FLIR	E60bx: 9006600
Ref. 3	Microprobe Thermometer	Physitemp	BAT-12
Ref. 4	Tailveiner	Bioseb	TV-150
Ref. 5	BD INTRAMEDIC™ Polyethylene Tubing	Becto-Dickinson	PE# 20
Ref. 6	BD INTRAMEDIC™ Polyethylene Tubing	Becto-Dickinson	PE# 50
Ref. 7	Stereotaxic for Rat and Mouse	KOPF, David Kopf Instruments	963
Ref. 8	1.0 µL, Neuros Syringe, Model 7001 KH, 32 gauge, Point Style 3	Hamilton Company	65458-01
Ref. 9	1 µL Microliter Syringe Model 7001 KH, Knurled Hub, 25 gauge, 2.75 in., point style 2	Hamilton Company	80135
Ref. 10	Steel Brain Matrix, 1.0mm, Coronal, 40-75g	Stoelting Co	51386
Ref. 11	TissueLyser II	Quiagen	85300
Ref. 12	Placas para microtitración	Deltalab	027-900011
Ref. 13	Microplate Spectrophotometer	Biotek Instruments, Inc	Epoch 2
Ref. 14	10 % Criterion™ Tris-HCl Protein Gel, 26 well, 15 µl	Bio-Rad	#3450011
Ref. 15	Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad	#1703940
Ref. 16	Extra Thick Blot Filter Paper, Precut, 14 x 16 cm	Bio-Rad	#1703968
Ref. 17	Immun-Blot® PVDF Membrane	Bio-Rad	1620177
Ref. 18	ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad	17001402
Ref. 19	BioRad Gel Doc™ XR+ system	Bio-Rad	#170-8195
Ref. 20	NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific	ND-2000
Ref. 21	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System, 96-well, 0.2 mL, laptop	Thermo Scientific	A28567
Ref. 22	SpeedVac Vacuum Concentrators	Thermo Scientific	SPD120
Ref. 23	ChromXP C18 150 × 0.30 mm, 3mmde tamaño de partícula y 120Å de tamaño de poro	Sciex	805-00120

Tabla 23: Programas informáticos

	Programa	Proveedor	Referencia
Ref. 1	Software FLIR Tools	FLIR	RRID:SCR_016330
Ref. 2	ImageJ NIH Image 1.8	National Institutes of Health	RRID: SCR_003070
Ref. 3	PeakView Software 2.2	Sciex	RRID:SCR_015786
Ref. 4	GraphPad Prism 8.0.2	GraphPad Software	RRID:SCR_002798

RESULTADOS

El trabajo presentado en esta tesis doctoral parte de estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación sobre el efecto que ejerce la lactancia prolongada en el desarrollo de obesidad. Se desarrolló un modelo animal de lactancia prolongada, donde un grupo de ratas Sprague Dawley fueron destetadas a los 21 días de edad como es el procedimiento habitual, y otro grupo a los 28, generando respectivamente un grupo de Lactancia Estándar (LE) y un grupo de Lactancia Prolongada (LP). Además, se expuso la mitad de los animales de cada grupo a una Dieta Control (DC) y el otro a una Dieta alta en Grasa (DG) para conocer el efecto de la lactancia prolongada en animales con obesidad inducida por la dieta.

De esta manera, se ha visto como las ratas adultas con lactancia prolongada y dieta alta en grasa presentan menor peso corporal que aquellas con lactancia estándar y misma dieta, sin que la ingesta se viera modificada. La caracterización del modelo mostró que la lactancia prolongada aumenta los niveles de la proteína FGF21 en hígado, que a nivel central activa la termogénesis en el tejido adiposo pardo y aumenta el gasto energético en ratas con obesidad inducida por dieta. Dada la complejidad del sistema de regulación de la homeostasis energética, en esta tesis hipotetizamos que existen múltiples mecanismos que promueven la protección contra la obesidad que ejerce la lactancia materna prolongada.

1 La lactancia prolongada modifica la expresión génica hepática

1.1 Estudio transcriptómico del modelo de lactancia prolongada

Para conocer si existen otras proteínas modificadas en tejido hepático por la prolongación de la lactancia relacionadas con el metabolismo energético, hemos generado el modelo murino de lactancia prolongada incluyendo los grupos experimentales con dieta alta en grasa, que son aquellos en los que la lactancia produjo un mayor efecto. Las ratas Sprague Dawley permanecieron 3 semanas con la madre antes del destete para recrear la lactancia estándar, y 4 semanas para el grupo de lactancia prolongada. El primer grupo continuó separado de la madre con dieta control desde las 3 hasta las 4 semanas de vida. Cuando ambos grupos cumplieron las 4 semanas, fueron alimentados con dieta alta en grasa hasta alcanzar las 12 semanas de edad.

Tal y como era esperado, la lactancia prolongada disminuyó el peso corporal de los animales hasta la edad adulta (Fig. 1A y B), sin verse afectada la ingesta (Fig. 1C y D). El peso medio del hígado es similar en ambos grupos, sin embargo, los tejidos grasos omental y gonadal presentaron un menor peso en el grupo de lactancia prolongada, mientras que el tejido adiposo pardo aumenta significativamente en este grupo (Fig. 1E-H). A nivel hepático realizamos una comprobación de los niveles de FGF21 en hígado para verificar que sus niveles están aumentados en el grupo de lactancia prolongada tal y como estaba descrito previamente por nuestro grupo (41) (Fig. 1I).

Realizamos un análisis de secuenciación de ARN del tejido hepático de los animales para comparar los niveles de expresión de todos sus genes. El análisis nos indica que ha sido identificado el ARN correspondiente a 13692 genes, de los cuales 102 se han encontrado niveles de ARN significativamente elevados en el grupo de lactancia prolongada, y 97 disminuidos.

El gráfico de dispersión, o *volcano plot* mostrado en la Fig. 2A muestra la relación entre el cambio de expresión génica (eje X) y la significancia estadística de dicho cambio (eje Y). Los genes que aumentan de expresión están marcados en verde, y los que disminuyen en rojo. Las etiquetas pertenecen a aquellos genes con cambio más significativo (*Onecut1*, *Socs2*, *Hsd17b2*, *Nr1d1*) y los que han sido seleccionados para posteriores estudios (*Banp*, *Klf15*, *Angptl4*).

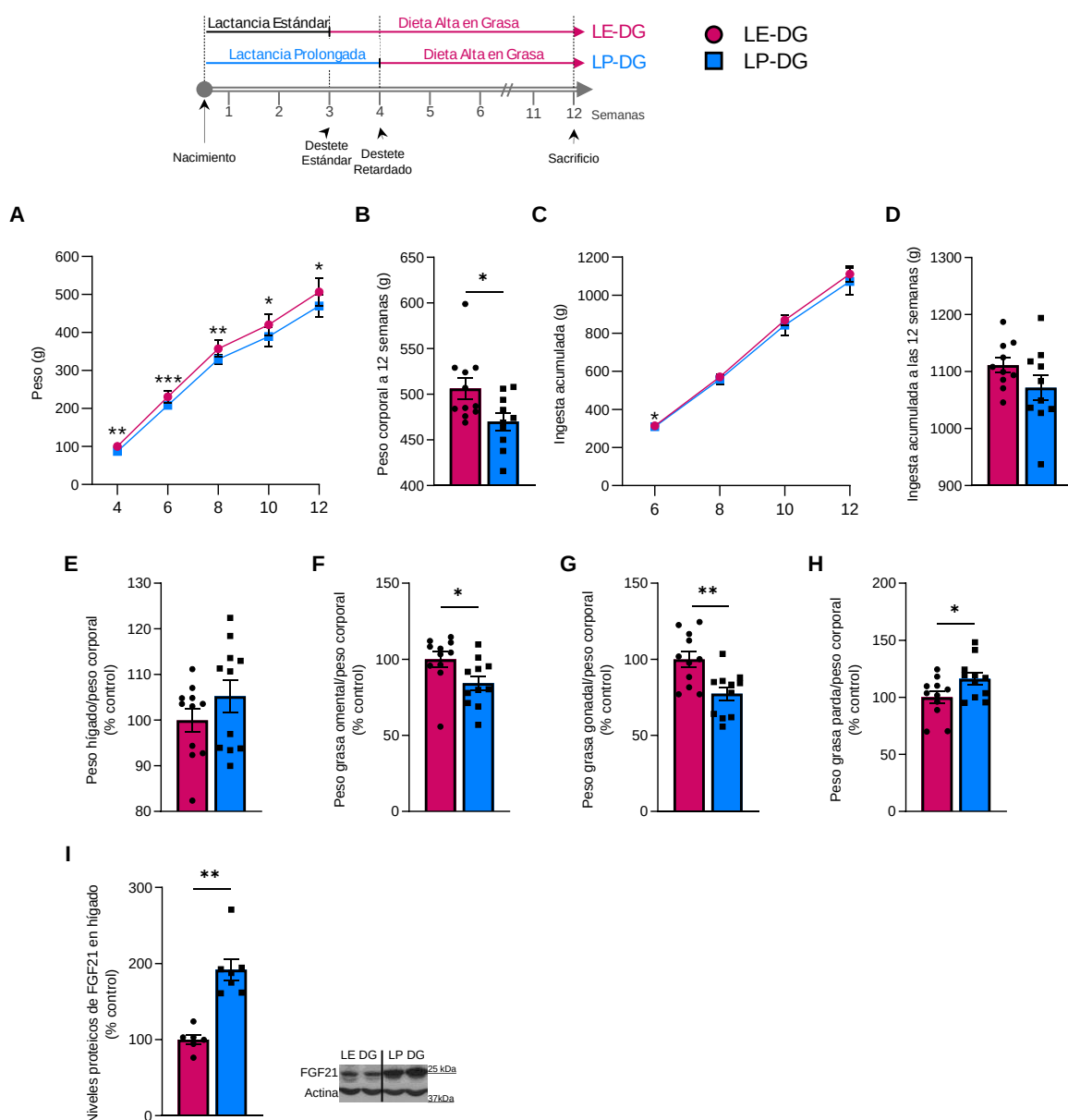


Figura 1. Efectos de la lactancia prolongada en la edad adulta. Peso corporal semanal (A) y a las 12 semanas (B), ingesta acumulada semanal (C) y a las 12 semanas (D), peso del hígado (E), de la grasa omental (F), de la grasa gonadal (G) y de la grasa parda (H) relativizado al peso corporal. Niveles de FGF21 en hígado (I). Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

El análisis de componentes principales o PCA (Fig. 2B) muestra la separación entre los dos grupos basándose en las diferencias globales de expresión génica. Solo el primer componente principal (Dim1) explica la mayor variabilidad observada, el 82 %, mientras que el segundo solamente añade un 5,3 % de variabilidad. Las elipses coloreadas indican las áreas de confianza para cada grupo, y teniendo en cuenta que no se solapan, se puede concluir una clara diferenciación entre los grupos. Esta conclusión se ratifica con el análisis de *clustering* que se muestra en el dendrograma colocado en la parte superior del mapa de calor en la Fig. 2C. Las

muestras en este árbol jerárquico también están perfectamente agrupadas por su tipo de lactancia, indicando que la expresión génica es más parecida entre muestras del mismo grupo.

El mapa de calor o *heatmap* de la Fig. 2C muestra el patrón de expresión de cada gen para cada muestra, en verde se muestran los genes sobreexpresados, de rojo los subexpresados. Este mapa apoya la hipótesis que existen patrones de expresión génica diferenciados entre los grupos, sugiriendo que la lactancia prolongada tiene un impacto sustancial en la regulación génica hepática.

Realizamos a continuación un análisis de interacción de los 199 genes que se encontraron significativamente modificados utilizando la base de datos STRING 12.0 para conocer si existen relaciones entre los genes modificados. Se pudieron identificar 192 genes, que se muestran en la Fig. 2D. El análisis estadístico, resumido en la tabla inferior, nos indica un mayor número de interacciones de las esperadas por azar, un promedio de 1,4 conexiones por proteína, un coeficiente de agrupamiento del 0,2, que indica que las proteínas tienden a formar grupos de interacción, y un valor p menor a 0,01, que indica que las interacciones observadas son significativas. Estos resultados sugieren que la lactancia prolongada en ratas con dieta alta en grasa induce cambios significativos en la expresión génica del hígado, y los genes modificados parecen interactuar conjuntamente.

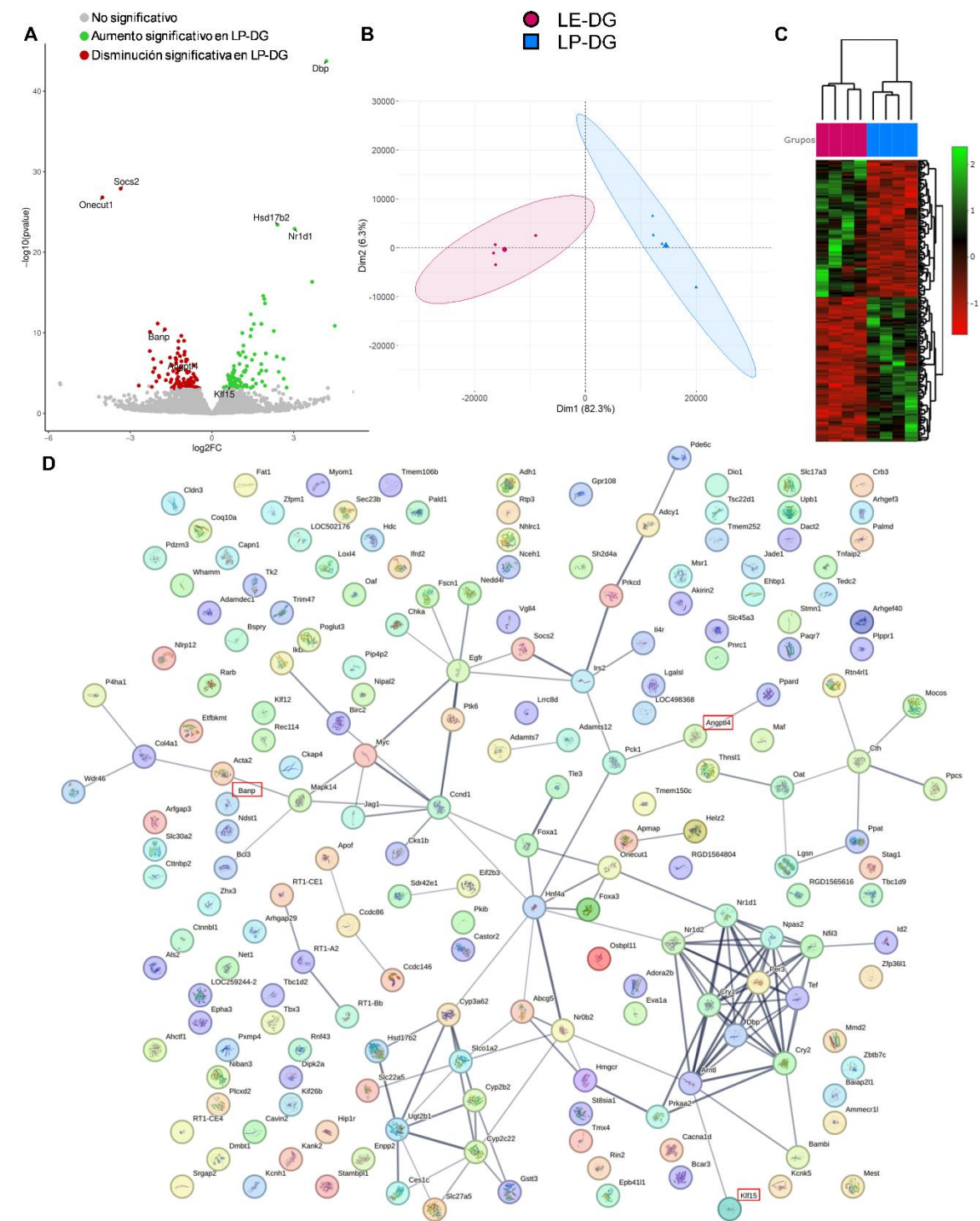
El último paso del análisis de resultados del RNA-seq fue un análisis de enriquecimiento funcional, realizado para identificar las funciones biológicas asociadas a los genes que presentaron cambios en su expresión. Para ello utilizamos un análisis de sobrerrepresentación u ORA con la base de datos GO (Ontología Genética) centrado en procesos biológicos. De los 199 genes modificados identificados en el RNA-seq, la base de datos reconoció 172.

El análisis arrojó un total de 24 rutas significativamente enriquecidas que se presentan en la Tabla 24. En la Figura 3A se muestran las funciones más enriquecidas entre los genes modificados, agrupadas en 5 categorías principales basadas en la similitud de anotaciones: estímulos relacionados con la diferenciación celular, metabolismo de carbohidratos y glucosa, regulación del almacenamiento de lípidos, sincronización del ritmo circadiano, y procesamiento y presentación de antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

La Figura 3B detalla las funciones individuales, ordenadas según su ratio genético, que se calcula como el cociente entre el número de genes asociados a la función y el total de genes modificados. El color de los puntos representa el valor p ajustado del enriquecimiento, mientras que el tamaño del punto indica el número de genes asociados a cada función. Entre las 15 funciones más representadas, algunas están directamente relacionadas con la mejora en el perfil metabólico de las ratas con lactancia prolongada, como la homeostasis de la glucosa, la homeostasis de carbohidratos, la respuesta a carbohidratos y el almacenamiento lipídico.

Las Figuras 3C y 3D muestran las proteínas asociadas a estas funciones y los cambios en su expresión con respecto al grupo control. Este análisis permite identificar proteínas que podrían estar involucradas en los efectos metabólicos de la lactancia prolongada. Entre ellas destacan genes bien conocidos, como *Angptl4*, que está asociada a la regulación del metabolismo de los lípidos y muestra una disminución en su expresión, y *Pparδ*, cuya expresión también disminuye y está involucrada en cuatro de las funciones metabólicas mencionadas o *Pck1*, que aumenta de expresión y también se relaciona con la regulación de lípidos y glucosa.

Con estos resultados podemos concluir la lactancia prolongada modifica la expresión de genes hepáticos que están significativamente relacionados con funciones del metabolismo energético, como la regulación de la glucosa o de los lípidos, que podrían ser parte del mecanismo protector contra la obesidad que activa la lactancia prolongada.



Nº proteínas	Nº interacciones	Grado medio de las proteínas	Coefficiente de clustering local	Nº interacciones esperadas	Valor p
192	134	1,4	0,267	43	<0,001

Figura 2. Análisis RNA-seq en hígado de ratas LE-DG y LP-DG (A) Diagrama de dispersión del cambio de expresión en todos los genes identificados. FC: *fold change*. Diferencia significativa establecida en FDR (*False Discovery Rate*) < 0.05. (B) Análisis de Componentes Principales, el símbolo más grande marca la media de cada grupo. (C) Mapa de calor de los genes con expresión modificada. (D) Análisis de interacción de los genes con expresión modificada, en la tabla inferior se resumen el análisis estadístico de las interacciones encontradas. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

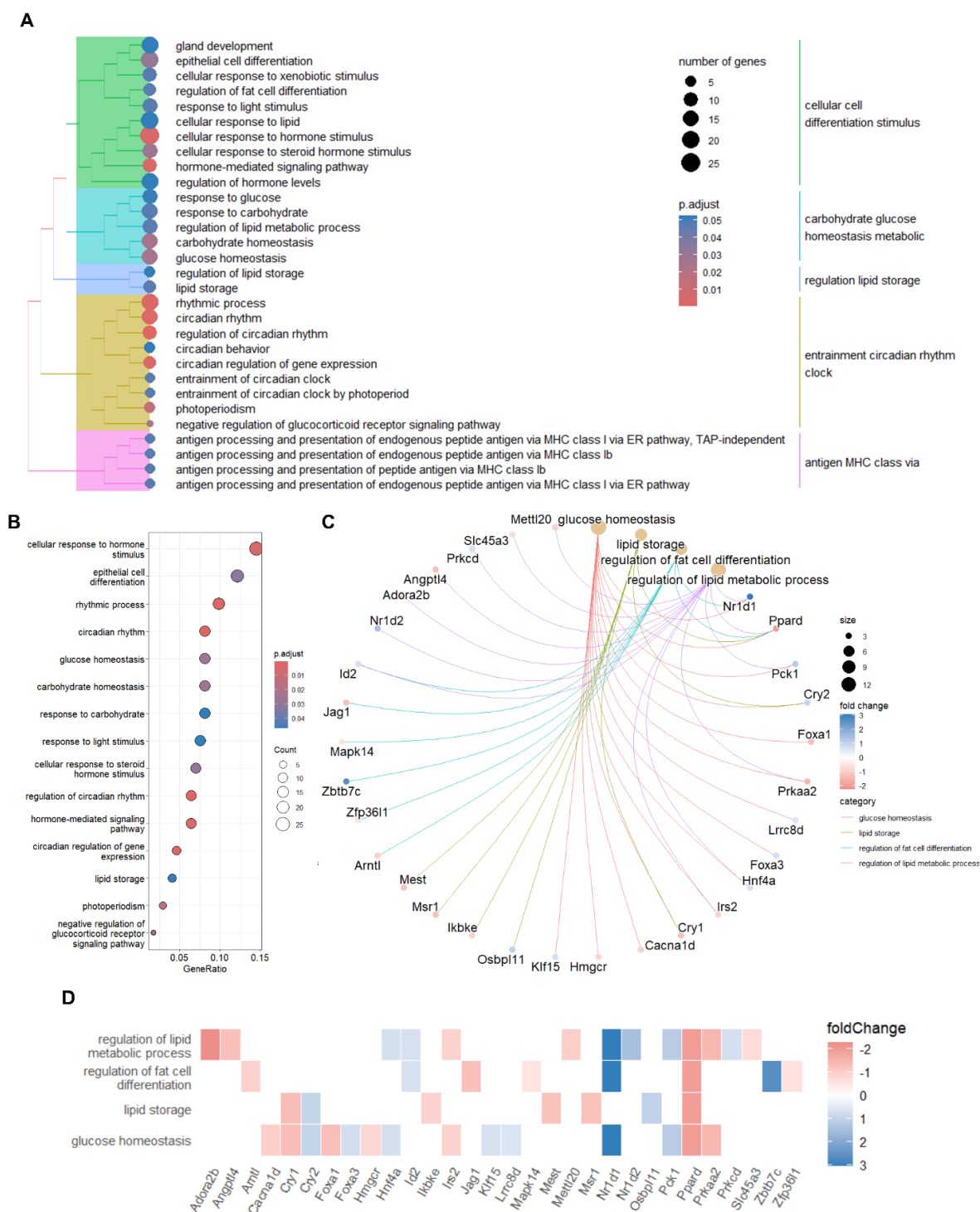


Figura 3. Resultados del análisis funcional de todos los genes modificados por RNA-seq en hígado de ratas con dieta alta en grasa y lactancia estándar y dieta alta en grasa y lactancia prolongada. (A) Principales funciones enriquecidas significativamente (valor p ajustado < 0.05) agrupadas por similitud. (B) Funciones modificadas significativamente con mayor ratio de genes (genes modificados que pertenecen a esa función / todos los genes modificados e identificados). (C) Selección de ciertas funciones enriquecidas significativamente relacionadas con el metabolismo energético y los genes modificados asociados a ellas. (D) Mapa de calor con los genes y funciones de la Figura C mostrando su asociación y cambio de expresión; azul indica mayor expresión y rojo menor.

Tabla 24: Funciones enriquecidas significativamente entre los genes modificados del análisis RNA-seq

ID	Descripción	Ratio	p-adj
GO:0042752	regulation of circadian rhythm	11/172	5.08E-04
GO:0007623	circadian rhythm	14/172	2.62E-03
GO:0032922	circadian regulation of gene expression	8/172	2.68E-03
GO:0048511	rhythmic process	17/172	2.68E-03
GO:0009755	hormone-mediated signalling pathway	11/172	3.72E-03
GO:0032870	cellular response to hormone stimulus	25/172	3.72E-03
GO:0009648	Photoperiodism	5/172	1.31E-02
GO:2000323	negative regulation of glucocorticoid receptor signalling pathway	3/172	2.26E-02
GO:0042593	glucose homeostasis	14/172	2.56E-02
GO:0033500	carbohydrate homeostasis	14/172	2.56E-02
GO:0071383	cellular response to steroid hormone stimulus	12/172	2.82E-02
GO:0030855	epithelial cell differentiation	21/172	3.12E-02
GO:0009416	response to light stimulus	13/172	4.71E-02
GO:0019915	lipid storage	7/172	4.71E-02
GO:0009743	response to carbohydrate	14/172	4.71E-02
GO:0043153	entrainment of circadian clock by photoperiod	4/172	4.71E-02
GO:0002476	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib	4/172	4.71E-02
GO:0002486	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-independent	4/172	4.71E-02
GO:0045598	regulation of fat cell differentiation	8/172	4.71E-02
GO:0002428	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class Ib	4/172	4.71E-02
GO:0002484	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway	4/172	4.71E-02
GO:0009649	entrainment of circadian clock	4/172	4.71E-02
GO:0071466	cellular response to xenobiotic stimulus	10/172	4.71E-02
GO:0019216	regulation of lipid metabolic process	13/172	4.71E-02

Ratio = genes modificados asociados a la función / genes modificados totales

p-adj = valor p ajustado según Benjamini-Hochberg

1.2 Validación de las dianas metabólicas KLF15, ANGPTL4 y BANP

Entre las proteínas significativamente modificadas identificadas en el análisis de RNA-seq, procedimos a validar mediante PCR algunas asociadas a procesos metabólicos que podrían explicar el fenotipo observado en los animales con lactancia prolongada.

Uno de los criterios para seleccionar los genes a validar fue identificar aquellos involucrados en la mayor cantidad de funciones relacionadas con el metabolismo lipídico y glucémico. En la Tabla 25 se muestran los genes seleccionados mediante este criterio, junto con las funciones metabólicas enriquecidas a las que están asociados.

Tabla 25: Genes seleccionados para validación y las funciones a las que están asociados.

Gen	Descripción	ID	Ratio	p-adj
<i>Angptl4</i>	regulation of lipid metabolic process	GO:0019216	13/172	4.71E-02
	acylglycerol homeostasis	GO:0055090	4/172	6.16E-02
	triglyceride homeostasis	GO:0070328	4/172	6.16E-02
<i>Klf15</i>	glucose homeostasis	GO:0042593	14/172	2.56E-02
	carbohydrate homeostasis	GO:0033500	14/172	2.56E-02
	intracellular glucose homeostasis	GO:0001678	10/172	5.26E-02
	regulation of glucose import	GO:0046324	5/172	8.71E-02
	positive regulation of glucose import	GO:0046326	4/172	1.06E-01
	positive regulation of glucose transmembrane transport	GO:0010828	4/172	1.34E-01

Ratio = genes modificados asociados a la función / genes modificados totales

p-adj = valor p ajustado según Benjamini-Hochberg

Además de la selección basada en la pertenencia a funciones enriquecidas, exploramos las principales funciones de los genes modificados significativamente de forma individual. Todo ello con la expectativa de que puedan existir genes modificados con importantes funciones metabólicas que no pertenezcan a una función identificada en base GO por falta de evidencia, o que esa función no haya sido reconocida como significativa. Así fue como se identificó el gen *Banp*, el cual se incluyó en el proceso de validación junto con *Angptl4* y *Klf15*.

En la Fig. 4 se presentan los resultados de la validación mediante PCR de los genes *Klf15*, *Angptl4* y *Banp* en tejido hepático. Los resultados muestran que los niveles de expresión de *Klf15* aumentan en el grupo de lactancia prolongada, mientras que los de *Angptl4* disminuyen, replicando los hallazgos del análisis de RNA-seq. Sin embargo, aunque el RNA-seq mostró una marcada disminución en los niveles de *Banp*, los resultados de la PCR no confirmaron este descenso, por lo que detenemos el estudio de esta proteína.

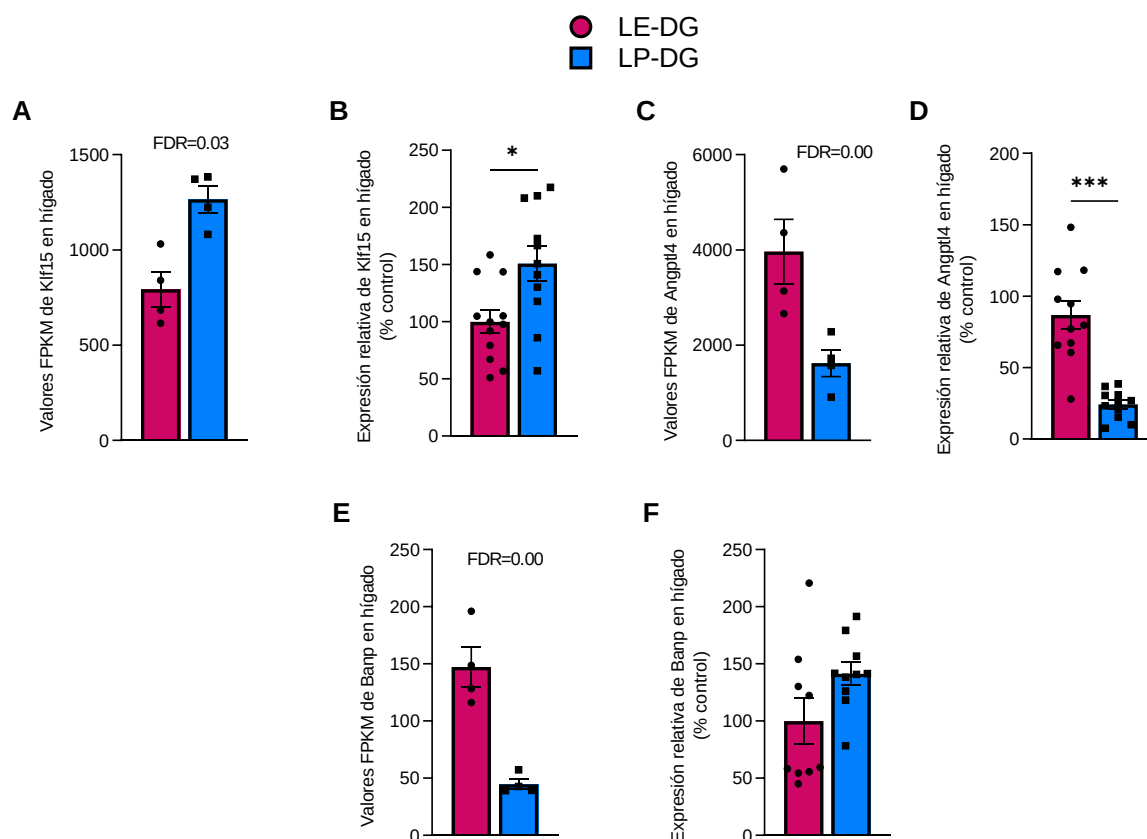


Figura 4. Validación por PCR del RNA-seq. Resultados de las lecturas del RNA-seq de los genes (A) Klf15, (C) Angptl4 y (E) Banp representadas en FPKM (Fragments per kilo base per million mapped reads). Indicado el valor FDR (False Discovery Rate), considerando diferencia significativa como FDR < 0,05. Resultados de PCR en hígado para (B) Klf15, (D) Angptl4 y (F) Banp representados como expresión relativa al gen de expresión constitutiva (Hprt) y al grupo control. Los datos están representados como media ± SEM. Diferencias estadísticas están indicadas como * p < 0,05, *** p < 0,001. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

2 Reproducción del modelo de lactancia prolongada

Para profundizar en el estudio de las proteínas validadas, hemos reproducido el modelo completo de lactancia prolongada, utilizando los cuatro grupos experimentales originales: lactancia estándar y dieta control (LE-DC), lactancia estándar y dieta alta en grasa (LE-DG), lactancia prolongada y dieta control (LP-DC), y lactancia prolongada y dieta alta en grasa (LP-DG). Esto nos permitió examinar el comportamiento de las proteínas en función de una, o ambas variables experimentales (lactancia y dieta).

En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos del modelo in vivo. Al analizar el efecto de la dieta alta en grasa, comparando el grupo LE-DG con su control en dieta LE-DC, se observa el aumento de peso esperado (Fig. 5A y B) sin variaciones significativas en la ingesta calórica total (Fig. 5C). La resonancia magnética mostró un incremento en el porcentaje de masa magra y grasa en los animales alimentados con dieta alta en grasa (Fig. 5D y E). Asimismo, los parámetros bioquímicos revelan un aumento significativo en los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres (Fig. 5F y G) esperable en animales con obesidad. La dieta alta en grasa en ratas con lactancia prolongada (LP-DC vs LP-DG) también

aumenta el peso, masa magra y masa grasa sin modificar la ingesta, aunque no ejerce ningún efecto sobre los triglicéridos y los ácidos grasos libres.

La lactancia prolongada en sí misma, en ratas alimentadas con dieta control, no parece tener un impacto significativo en los parámetros analizados. La comparación entre los grupos LE-DC y LP-DC no mostró diferencias relevantes en ninguno de los parámetros medidos. Al comparar los efectos de la lactancia prolongada en el contexto de la dieta alta en grasa (LE-DG vs LP-DG), podemos ver que la lactancia prolongada disminuye el peso corporal, sin cambios en la ingesta calórica. La masa magra no se vio afectada, pero hubo una reducción significativa en la masa grasa. Asimismo, se detectó una disminución en los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres en las ratas con lactancia prolongada.

En conclusión, al igual que en nuestros anteriores estudios, la lactancia prolongada no parece ejercer efectos metabólicos significativos en ratas con dieta control. No obstante, cuando se desafía al organismo con una dieta alta en grasa, la lactancia prolongada parece tener efectos atenuantes de la obesidad. Aunque las ratas con lactancia prolongada y dieta alta en grasa presentan un aumento de peso con respecto a aquellas con dieta control, este aumento es significativamente menor en comparación con las ratas con lactancia estándar, a pesar de tener una ingesta calórica similar. Esta reducción de peso se debe a una disminución en la masa grasa, sin afectar la masa magra, y está asociada con mejoras en los parámetros bioquímicos, como los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres en plasma.

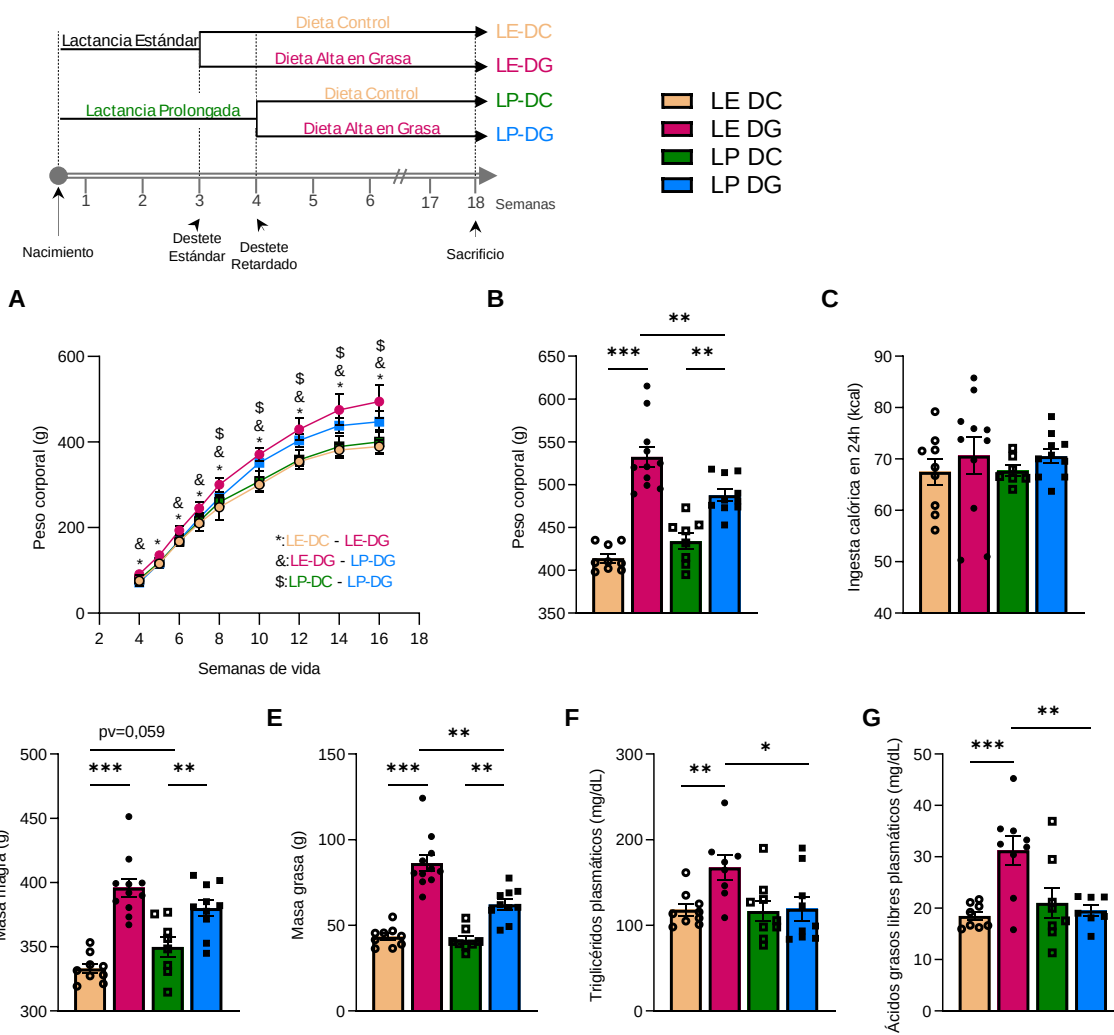


Figura 5. Caracterización del modelo de lactancia prolongada (A) Peso corporal semanal y (B) a las 12 semanas de vida. (C) masa grasa y (D) masa magra analizado por resonancia magnética. (E) Ingesta en 24h en Kcal. (F) Niveles de triglicéridos plasmáticos y (G) ácidos grasos libres. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

3 ANGPTL4 está regulado por la lactancia prolongada en ratas adultas

3.1 ANGPTL4 está presente en leche y sus niveles varían con la lactancia prolongada

Tras identificar la asociación del gen *Angptl4* con funciones enriquecidas en el modelo asociadas al metabolismo de lípidos, nuestro objetivo fue determinar su presencia y regulación en diferentes tejidos, así como mucosa gástrica, por la lactancia materna prolongada, y su presencia y regulación en la leche materna.

En la Figura 6A podemos ver el patrón de bandas correspondiente a ANGPTL4 en distintos tejidos. Se confirma la presencia en todos ellos de la forma de 50 kDa aunque también pueden verse otras bandas. Destaca una forma más pesada en LHA, y una más ligera, alrededor de 25 kDa en hígado y tejidos grasos.

También hemos identificado ANGPTL4 en leche, tanto humana como de rata. En la Figura 6B se puede observar una cuantificación de la leche extraída de rata a distintos tiempos de lactancia, apareciendo un aumento significativo 4 semanas después del parto con respecto a las 3 semanas. Estos datos se corroboran con el estudio de la proteína en leche humana, viéndose en la Figura 6C que la leche madura presenta niveles significativamente elevados de ANGPTL4 en comparación con el calostro.

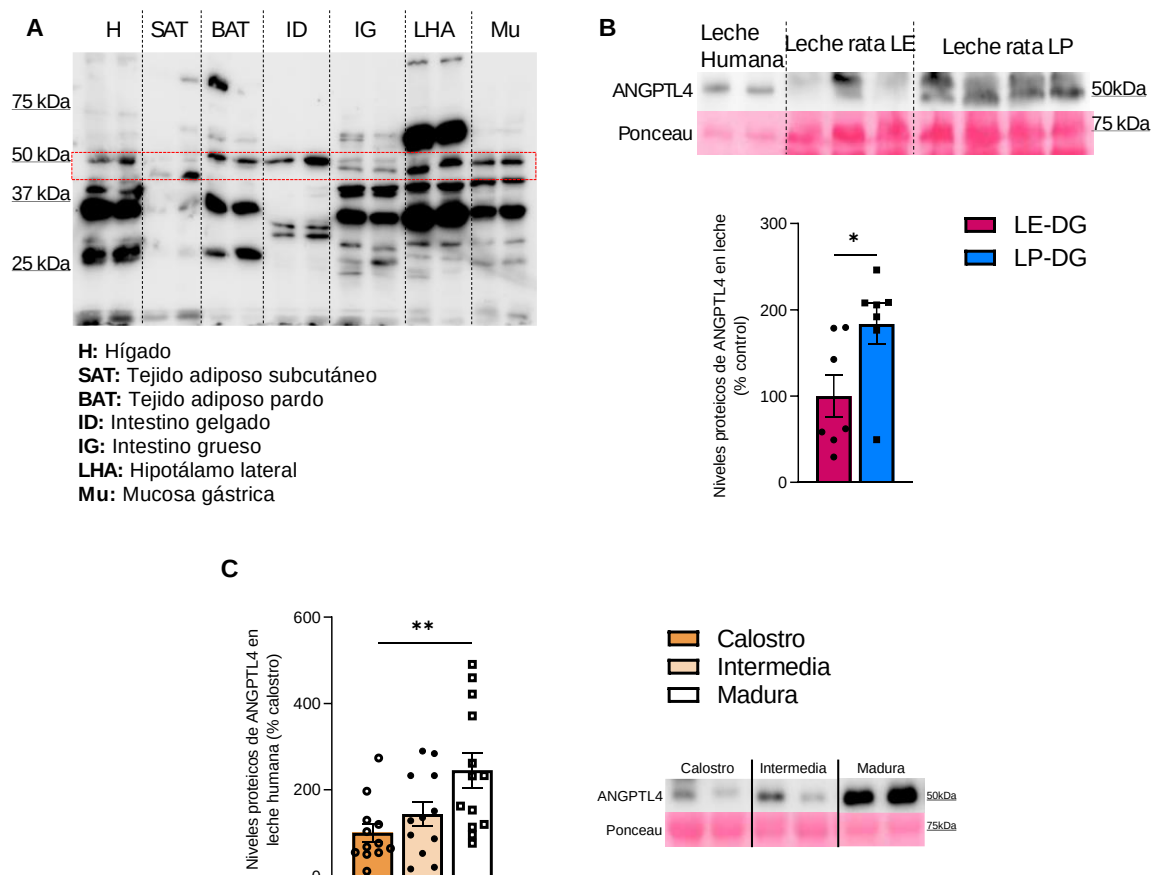


Figura 6. Estudio en distintos tejidos y leche de ANGPTL4 (A) ANGPTL4 en diferentes tejidos, marcado en rojo la forma activa correspondiente. (B) ANGPTL4 en leche humana madura (tras 1 mes de lactancia) y leche de rata extraída al terminar la LE y la LP. Debajo, cuantificación de leche de rata en LE y leche de rata en LP (C) Niveles de ANGPTL4 en leche humana a diferentes tiempos de lactancia; calostro hasta la 1ª semana, intermedia hasta el 1º mes, madura a partir del 1º mes. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: dieta grasa. DC: dieta control.

3.2 ANGPTL4 en hígado y plasma está modificado por la lactancia prolongada en ratas adultas

Para continuar con la validación de los resultados de RNA-seq con respecto a la proteína ANGPTL4, se estudiaron sus niveles en el tejido hepático del modelo de rata de lactancia prolongada. En la Figura 7A puede observarse un aumento de los niveles causados por la dieta alta en grasa en las ratas con lactancia estándar. Sin embargo, la dieta alta en grasa no provoca este aumento en las ratas con lactancia prolongada, si no que los niveles disminuyen.

También se realizó un análisis de ANGPTL4 para conocer si sus niveles circulantes están modificados por las variables de estudio. Como se observa en la Figura 7B, no existen cambios significativos de la proteína provocados por la dieta alta en grasa ni por la lactancia prolongada *per se*. Sin embargo, sí existe un descenso cuando a las ratas con lactancia prolongada se las expone a una dieta alta en grasa.

El análisis de los niveles de ANGPTL4 en hígado del modelo de lactancia prolongada validan los resultados del RNA-seq y de la RT-PCR realizadas en este mismo tejido; en ratas

expuestas a dieta alta en grasa, la lactancia prolongada provoca una disminución de ANGPTL4. Sin embargo, el efecto aislado tanto de la dieta alta en grasa como de la lactancia prolongada provocan el efecto contrario; un aumento de los niveles de ANGPTL4. En plasma esta proteína parece solo verse disminuida por la dieta alta en grasa en ratas con lactancia prolongada, no así en ratas con lactancia estándar, ni tampoco por cambios en el tiempo de lactancia.

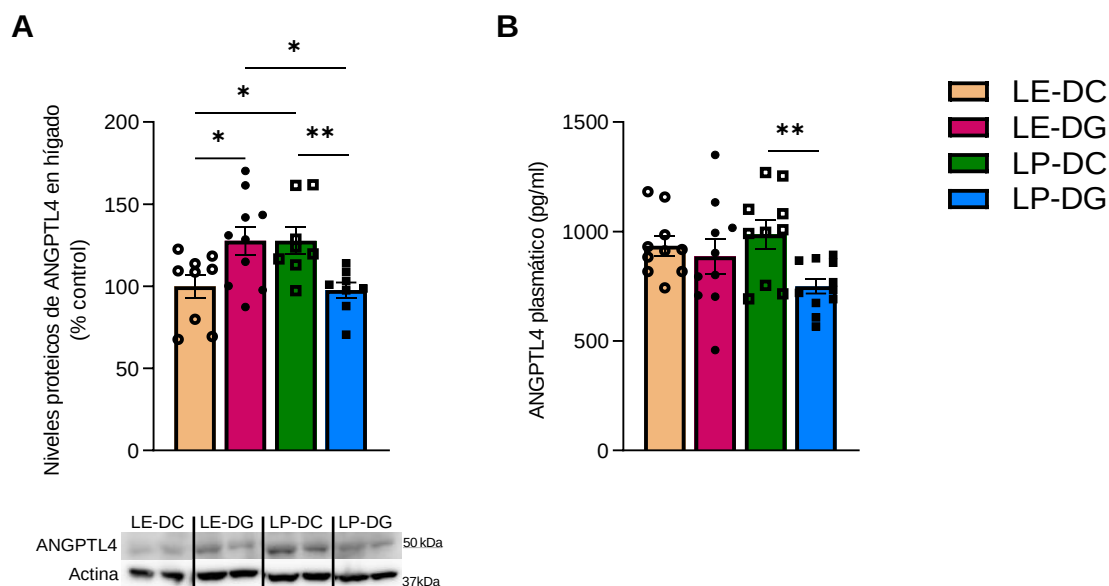


Figura 7. (A) Niveles de ANGPTL4 en tejido hepático. (B) ANGPTL4 en plasma obtenidos por ELISA. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

Para conocer en que etapa de la vida se comienzan a producir los cambios que provoca la dieta y la lactancia en los niveles de ANGPTL4 en hígado y plasma se pusieron en marcha diferentes modelos a corto plazo. El primero termina en el momento del destete, y consta de los grupos de lactancia estándar y lactancia prolongada. Tal y como se esperaba, las ratas del grupo de lactancia prolongada tienen mayor peso corporal que el grupo de lactancia estándar, debido a que tienen una semana más de vida (Figura 8A). Por otro lado, los niveles de ANGPTL4 no sufren variaciones ni en hígado ni en plasma (Figura 8B y C).

En el segundo modelo se incluye el factor de la dieta. Las ratas de lactancia estándar se destetan, como de costumbre, a las 3 semanas de vida, y continúan hasta las 4 semanas con dieta control. Mientras, las ratas de lactancia prolongada continúan en la caja con la madre. De la semana 4 a la 5 las ratas, ya destetadas, son expuestas a dieta alta en grasa hasta la semana 5, cuando se realiza el sacrificio.

A las 4 semanas de vida ya puede verse que, a pesar de tener la misma dieta, los animales con lactancia prolongada presentan menor peso corporal, que se mantiene hasta la semana 5 (Figuras 8D y E). Esta bajada de peso no parece verse explicada por una menor ingesta, ya que no es significativa (Figura 8F), y se debe a una disminución de masa grasa, siendo la masa magra constante (Figuras 8G y H). Al analizar los niveles de ANGPTL4 en el hígado, se puede observar que tampoco aparecen cambios (Figura 8I).

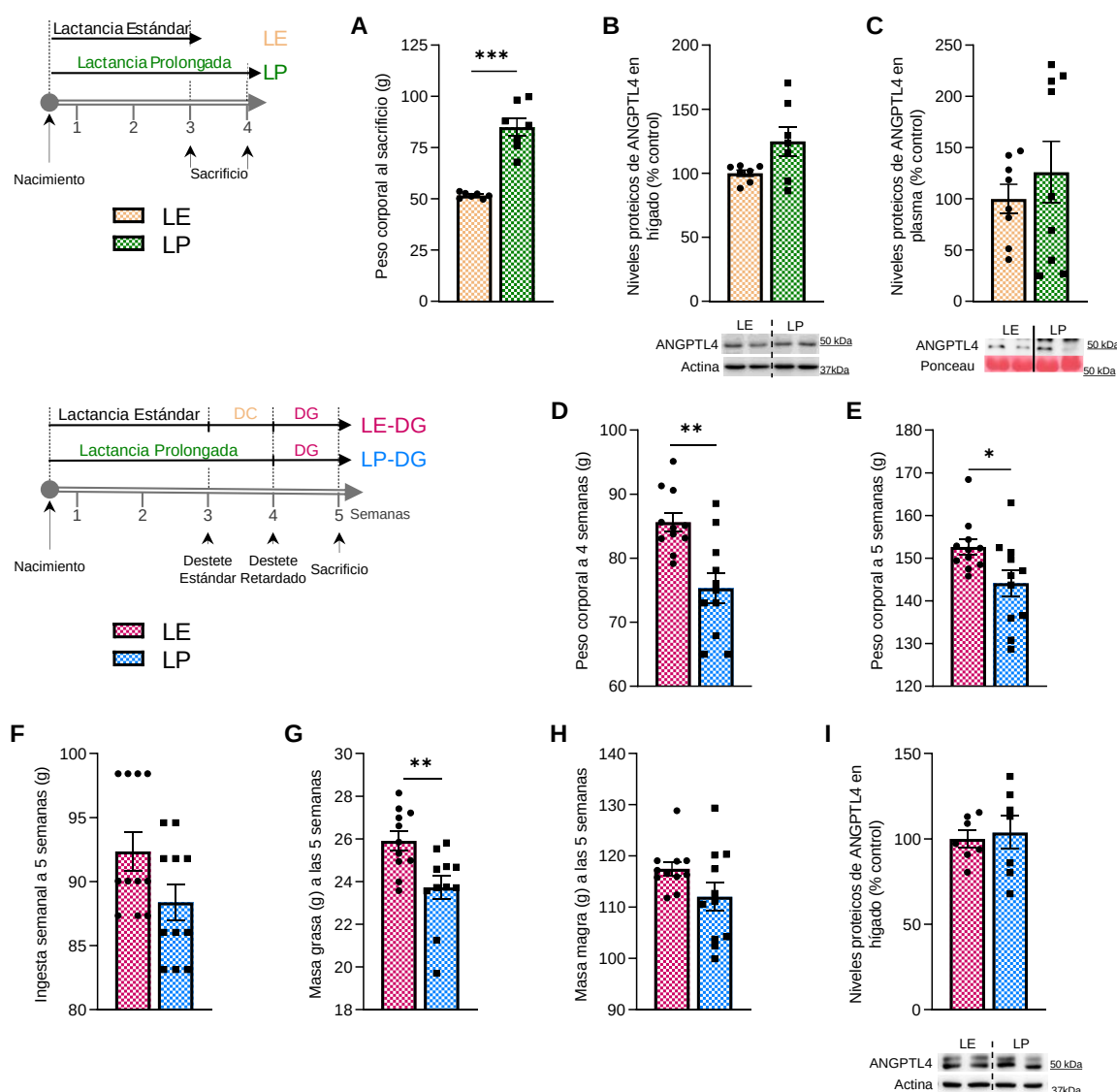


Figura 8. Estudio de ANGPTL4 en ratas jóvenes. (A) Peso corporal de los animales tras el destete. Niveles de ANGPTL4 en animales recién destetados en (B) hígado y (C) plasma. (D) . Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

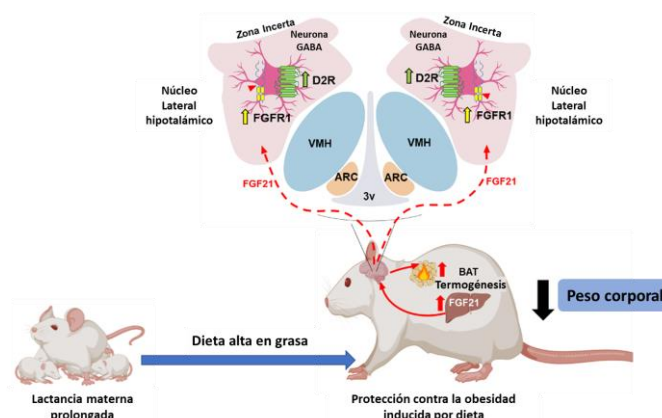
Los resultados de los modelos a corto plazo parecen indicar que ANGPTL4 no se modifica desde fases tempranas de edad por la lactancia materna, ni en ratas recién destetadas ni en ratas de 5 semanas tras una semana de dieta alta en grasa. Sin embargo, en ratas adultas de 18 semanas con obesidad inducida por dieta se observa una disminución de los niveles de ANGPTL4 con por la lactancia prolongada, del mismo modo que se veía en su expresión por RNA-seq y PCR.

4 La regulación de ANGPTL4 en el SNC está mediada por FGF21

Tras validar los datos obtenidos por RNA-seq en hígado se ha procedido a comprobar si, al igual que en el modelo publicado anteriormente por el grupo sobre la lactancia prolongada

(Ilustración 6), existen también cambios a nivel del sistema nervioso central que puedan contribuir al cambio fenotípico que sufren las ratas con prolongación de la lactancia.

Ilustración 6: Resumen gráfico de la protección contra la obesidad por la lactancia prolongada (41)



Obtenido de Pena-Leon, V., Folgueira, C., Barja-Fernández, S. et al. Prolonged breastfeeding protects from obesity by hypothalamic action of hepatic FGF21. *Nat Metab* 4, 901–917 (2022). <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00602-z>.

Se analizaron los niveles de proteína ANGPTL4 en el LHA de las ratas con lactancia estándar y dieta control (LE-DC), lactancia estándar y dieta alta en grasa (LE-DG) y lactancia prolongada y dieta alta en grasa (LP-DG) para comprobar si, en ratas con obesidad inducida por dieta, la lactancia prolongada modificaba ANGPTL4 hipotalámico.

En la Figura 9A podemos observar como la dieta alta en grasa disminuye los niveles de ANGPTL4 en hipotálamo con respecto al grupo de dieta control. Con dieta alta en grasa, la lactancia prolongada aumenta los niveles, revirtiéndolos a niveles equiparables a la dieta control. Para comprobar si esta modificación es debida a un aumento de la expresión de ANGPTL4 en LHA, o, por el contrario, los niveles de proteína provienen de algún otro tejido, se realizó una PCR. En la Figura 9A se muestra que existe expresión de ANGPTL4 en el LHA, pero además, parece haber una tendencia a su aumento en las ratas con lactancia prolongada y obesidad inducida por dieta.

Para ahondar en la posible funcionalidad de ANGPTL4 en el LHA, se midieron también los niveles de LPL; la enzima diana de ANGPTL4 (Figura 9C). Se ha encontrado que su patrón de expresión entre los grupos es el contrario que el de ANGPTL4; aumenta con la obesidad inducida por dieta, y disminuye cuando a esta se le añade el factor de la lactancia prolongada, el patrón contrario a ANGPTL4.

Estos datos sugieren que ANGPTL4 está regulado en LHA por la lactancia prolongada en ratas con dieta alta en grasa. Su regulación funciona de forma sincrónica con la mostrada anteriormente por nuestro grupo para la proteína hepática FGF21 en este mismo tejido; aumenta con la lactancia prolongada en ratas con obesidad inducida por dieta. Además, los niveles de LPL concuerdan con la función que ANGPTL4 ejerce sobre ella, disminuir sus niveles y con ello su funcionalidad.

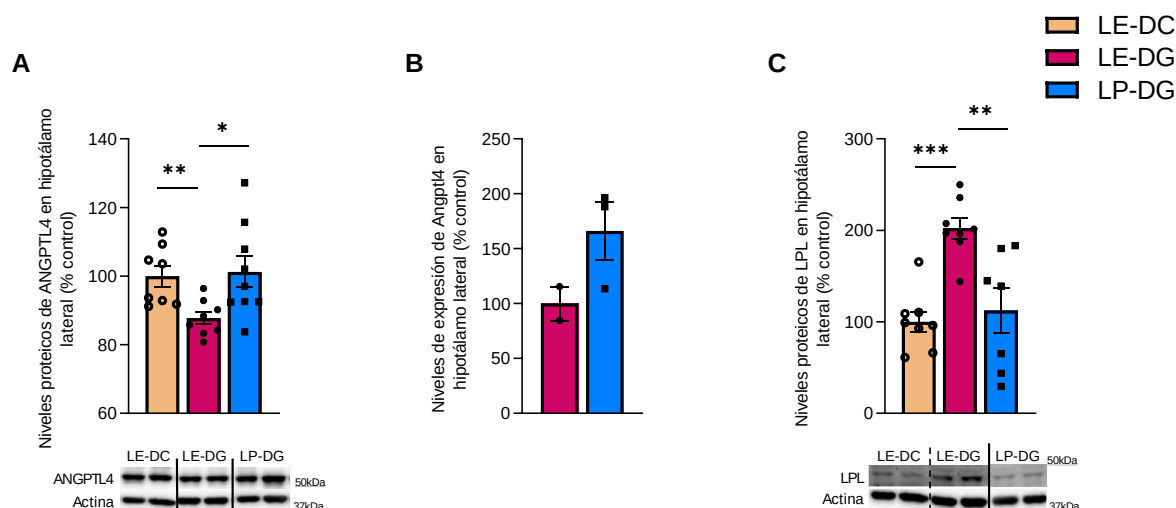


Figura 9. Estudio de ANGPTL4 en sistema nervioso central. (A) Niveles de ANGPTL4 y (B) de LPL en hipotálamo lateral. (C). Expresión de ANGPTL4 en el hipotálamo lateral. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

4.1 FGF21 en SNC provoca un aumento de ANGPTL4 en LHA

Teniendo en cuenta la concordancia existente entre los niveles de ANGPTL4 en LHA y los de FGF21 en el modelo de lactancia prolongada, se procedió a comprobar si existe interacción entre ambas proteínas. Para ello, se utilizaron ratas adultas alimentadas con dieta control, a las que se le administró por inyección ICV 0.4ug de FGF21. Se realizaron sacrificios a las 2, 4 y 8 horas.

En la Figura 10A se observa que la administración de FGF21 no genera cambios en peso en comparación con los animales inyectados con salino en los tiempos estudiados. Como ya habíamos demostrado anteriormente, FGF21 a nivel central provoca un aumento de termogénesis a los tiempos estudiados. Para comprobar la efectividad de la inyección, hemos realizado un análisis de la temperatura escapular, y pudimos observar que, no existiendo cambios en la temperatura corporal de los animales (Figura 10B), sí se observa un aumento de la temperatura del tejido adiposo marrón. En la Figura 10C se representa la cuantificación de las fotos térmicas realizadas a los distintos tiempos, encontrándose un aumento significativo de la termogénesis ya desde la 2ª hora tras la administración, que se mantiene constante hasta las 8 horas.

Al analizar los niveles de ANGPTL4 en LHA se ha descubierto un aumento significativo en los animales sacrificados 8 horas tras la inyección de FGF21 (Figura 10D). Con esto, podemos concluir que FGF21 a nivel del sistema nervioso central provoca un aumento de la termogénesis, y podría estar alterando los niveles de ANGPTL4 en LHA.

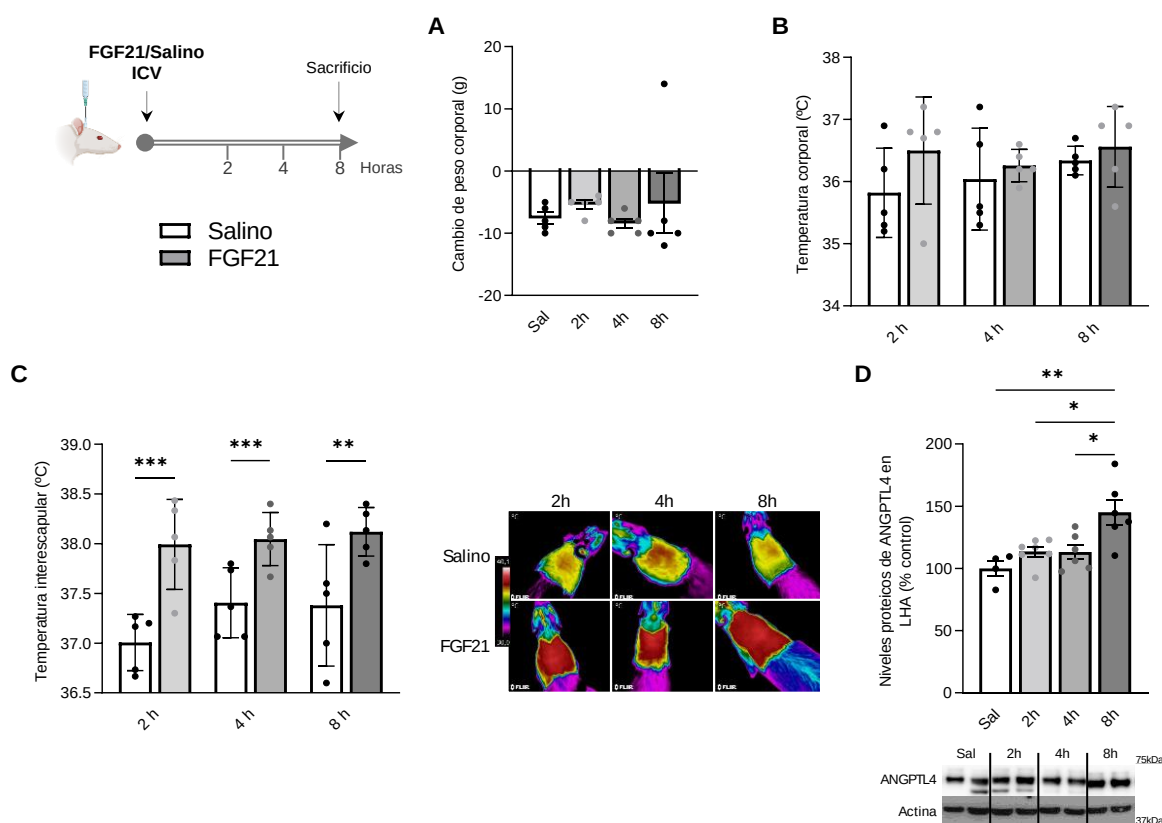


Figura 10. Efectos de la administración de FGF21 ICV (A) cambio de peso corporal desde el momento de la administración de FGF21 hasta el sacrificio, en el grupo salino se incluyen ratas sacrificadas a los distintos tiempos. (B) Temperatura corporal. (C). Temperatura interescapular y a fotos térmicas representativas. (D) Niveles de ANGPTL4. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen.

4.2 La inhibición de FGF21 hepático disminuye los niveles de ANGPTL4 en LHA

La lactancia prolongada provoca en ratas con dieta alta en grasa un aumento de los niveles de FGF21 en LHA a través de su mayor expresión en tejido hepático, que eleva sus niveles en plasma y llega al SNC (Ilustración 6, (41)). Al conocer que la lactancia prolongada en estas ratas también eleva los niveles de ANGPTL4 en LHA, y la inyección de FGF21 en el SNC mimetiza estos efectos, decidimos estudiar si el FGF21 hepático es el responsable del aumento de ANGPTL4 en LHA.

Para ello, realizamos el experimento de lactancia prolongada con sólo dos grupos, ratas con lactancia estándar y con lactancia prolongada, ambos expuestos a dieta alta en grasa tras el destete. A las 11 semanas de vida el grupo de lactancia prolongada se dividió en dos, generando un tercer grupo al que se administró por la vena de la cola el lentivirus shFGF21 para provocar el silenciamiento de dicha proteína.

La Figura 11A muestra el seguimiento de peso realizado a los tres grupos desde el principio del experimento, donde se puede ver cómo se desarrolla con normalidad el modelo de lactancia prolongada. Antes de la administración de los virus, ambos grupos de lactancia prolongada presentan un peso significativamente menor. Tras la administración del virus el grupo de lactancia prolongada a los que se les inyectó el lentivirus vacío que codifica la Luciferasa (shLuciferasa) no presenta cambio alguno con respecto a su grupo control de lactancia. Sin

embargo, tres semanas tras la inyección del shFGF21, las ratas de lactancia prolongada de dicho grupo dejan de presentar diferencias con las ratas de lactancia estándar. A la semana 18 han aumentado tanto de peso que ya presentan diferencias significativas con su grupo homólogo de lactancia prolongada pero inyectadas con shLuciferasa. Los cambios observados en peso no pueden ser explicados por un cambio en la ingesta, (Figuras 11C y D). Además, la resonancia magnética indica que el aumento de peso que sufre el grupo shFGF21 se debe a un aumento de la masa grasa y no de la masa magra (Figuras 11E y F).

Como comprobación de la correcta inhibición de FGF21 se realizó primero una prueba de calorimetría escapular, donde se observa un incremento de la temperatura del tejido adiposo pardo (BAT) en las ratas con lactancia prolongada, que es revertido con el silenciamiento de FGF21 (Figuras 11G y H). Terminado el experimento, se corroboró que los niveles de FGF21 estaban aumentados en el grupo de lactancia prolongada y devueltos a niveles similares a la lactancia estándar con su inhibición, tanto en hígado como en plasma (Figuras 11Y y J).

Una comprobación de la concentración de triglicéridos plasmáticos revela que, a parte del gasto energético, el metabolismo de lípidos también podría estar regulado por FGF21 plasmático ya que, al inhibir esta proteína, se pierde el efecto reductor de triglicéridos que parece tener la lactancia prolongada (Figura 11K).

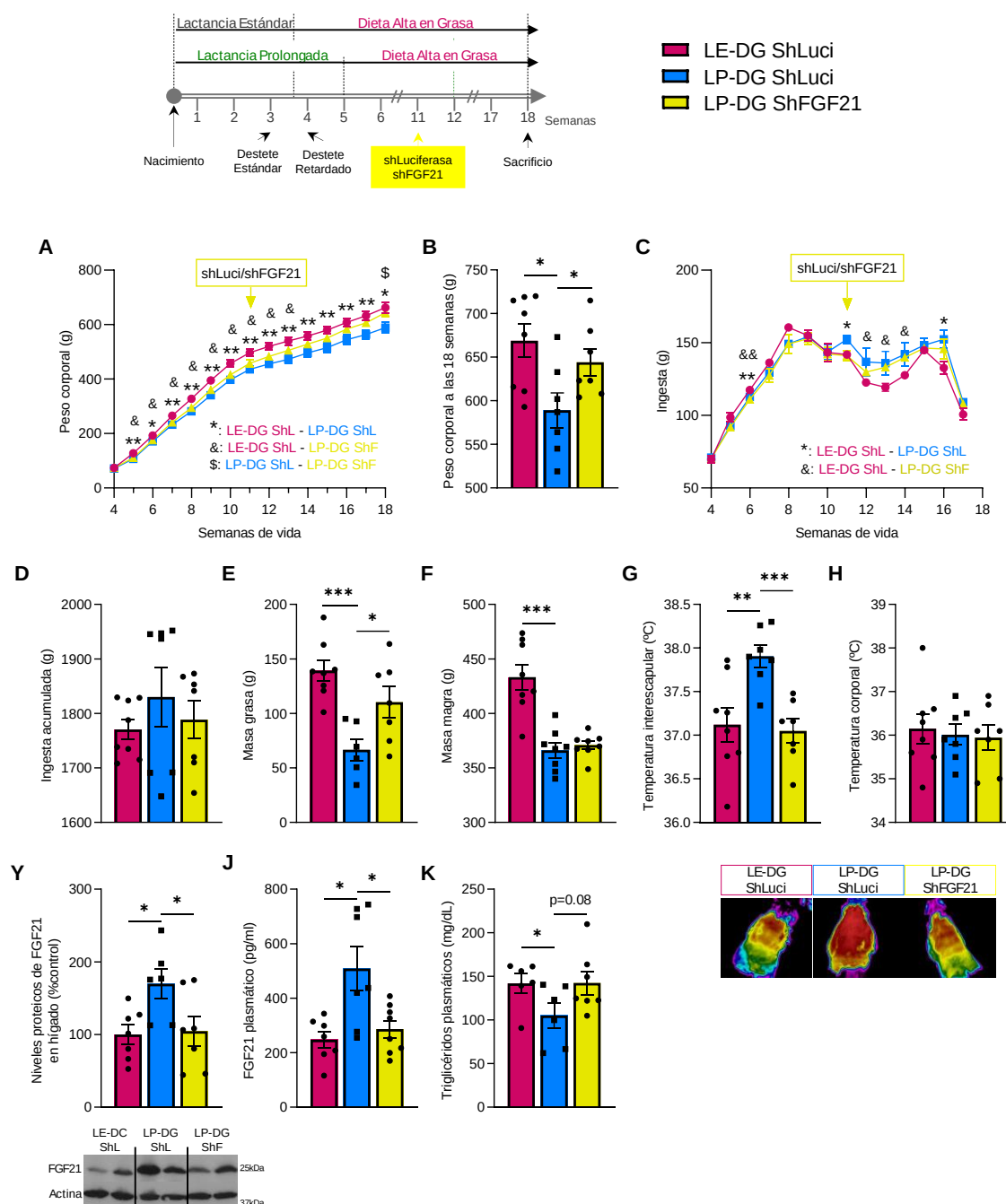


Figura 11. Efecto de la inhibición de FGF21 hepático en el modelo de lactancia prolongada. (A) Seguimiento semanal del peso corporal. (B) Peso corporal a las 18 semanas de vida. (C) Seguimiento semanal de la ingesta. (D) Ingesta acumulada a las 18 semanas de vida. (E) Masa grasa y (F) magra a las 18 semanas de edad. (G) Temperatura interescapular y debajo imágenes representativas, y (H) temperatura corporal. (Y) Niveles proteicos de FGF21 en hígado y (J) plasma. (K) Niveles de triglicéridos en plasma. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

Tras el análisis de los parámetros físicos y bioquímicos periféricos, analizamos FGF21 y ANGPTL4 en el LHA. Tal y como habíamos demostrado anteriormente, FGF21 aumenta en LHA con la lactancia prolongada, y la su inhibición en tejido hepático bloquea este aumento

(Figura 12A). En cuanto a ANGPTL4, reproduciendo los resultados del modelo completo (Figura 8A), la lactancia prolongada aumenta sus niveles (Figura 12B), y el silenciamiento de FGF21 hepático los revierte.

Finalmente, un análisis de LPL indica un patrón de expresión totalmente opuesto al de ANGPTL4, con una marcada disminución provocada por la prolongación de la lactancia, y una recuperación total de sus niveles de lactancia estándar cuando FGF21 es inhibido (Figura 12C).

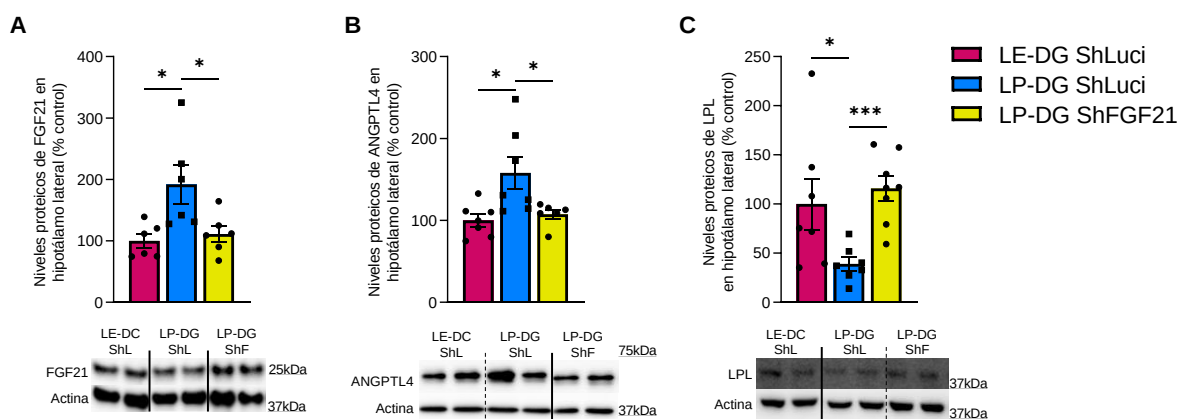


Figura 12. Efecto de la inhibición de FGF21 hepático en hipotálamo lateral. Niveles de (A) FGF21, (B) ANGPTL4 y (C) LPL en hipotálamo lateral. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

De esta forma, podemos concluir que el aumento que la lactancia prolongada provoca en los niveles hepáticos de FGF21 y que llega al LHA a través del plasma es necesario para provocar el aumento observado de ANGPTL4 en LHA. Además, LPL, la enzima inhibida por ANGPTL4, está modulada tanto por la lactancia como por la presencia de FGF21 en LHA de forma opuesta a ANGPTL4, sugiriendo que entre las funciones que pudiera tener ANGPTL4 en LHA podría estar incluida la regulación de LPL.

5 KLF15 está regulado por la lactancia prolongada desde edades tempranas

5.1 KLF15 está presente en leche y sus niveles en humanos varían con la lactancia prolongada

Para el estudio de KLF15, otra de las dianas validadas a partir del análisis de RNA-seq del tejido hepático de ratas con lactancia prolongada, se ha procedido al estudio de su expresión en diferentes tejidos y leche de origen murino y humano.

Comenzamos con una prueba del anticuerpo de KLF15 en diferentes tejidos de rata donde se puede observar un patrón de bandeo ligeramente distinto para algunos de ellos (Figura 13A), se indica en rojo la banda identificada como KLF15. Pudimos detectar la presencia de KLF15 tanto en leche de origen humano como de rata como se muestra en la Figura 13B, la cuantificación de sus niveles en rata, mostrada justo debajo, no indica diferencias entre los tiempos de lactancia, aunque hay cierta tendencia al descenso con su prolongación.

Al analizar los niveles de KLF15 en leche materna humana obtenida a diferentes tiempos de lactancia, se observa un aumento de sus niveles con el tiempo (Figura 13B). Estos resultados

indican que KLF15 está presente tanto en leche humana como de rata, aunque su regulación por el tiempo podría ser distinta entre las especies.

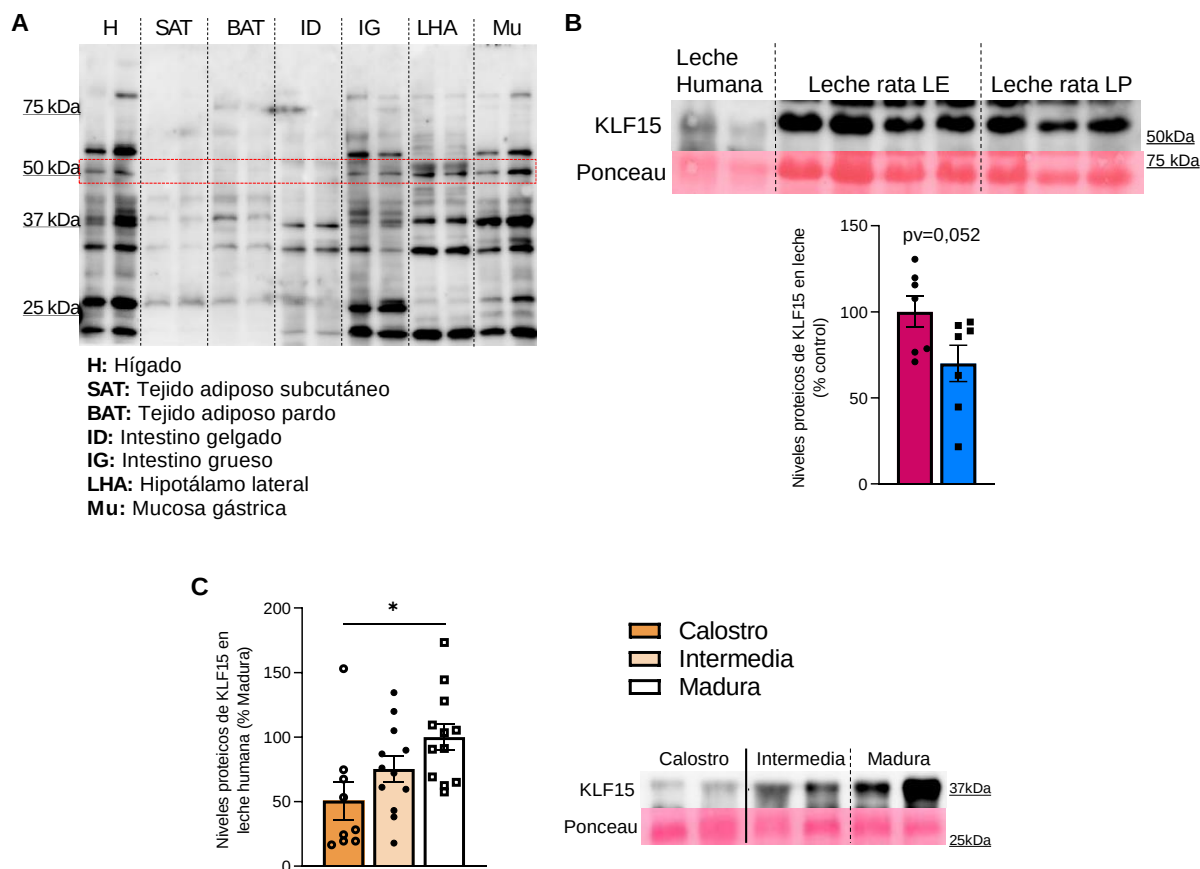


Figura 13. Estudio en distintos tejidos y leche de KLF15 (A) KLF15 en diferentes tejidos, marcado en rojo la banda analizada. (B) KLF15 en leche humana madura (tras 1 mes de lactancia) y leche de rata extraída al terminar la LE y la LP. Debajo, cuantificación de leche de rata en LE y leche de rata en LP (C) Niveles de KLF15 en leche humana a diferentes tiempos de lactancia; calostro hasta la 1ª semana, intermedia hasta el 1º mes, madura a partir del 1º mes. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: dieta grasa. DC: dieta control.

5.2 La regulación de KLF15 por la lactancia prolongada depende de la edad

Realizamos un análisis de los grupos del modelo de lactancia prolongada presentada en la página 68 para comprobar la regulación de KLF15 tanto por lactancia como por dieta. En tejido hepático (Figura 14A) KLF15 aumenta significativamente con la dieta alta en grasa y, sin embargo, esta dieta no produce ningún efecto cuando se trata de ratas con lactancia prolongada. En ratas con obesidad inducida por dieta la lactancia prolongada disminuye los niveles de KLF15. En cuanto al análisis en plasma, no se observan modificaciones generadas ni por la dieta alta en grasa ni por la lactancia prolongada (Figura 14B).

Por lo tanto, los niveles de KLF15 en el tejido hepático no concuerdan con su expresión, ya que como podemos ver en la Figura 4, tanto la expresión medida por RNA-seq como por PCR, el gen aumenta con la lactancia prolongada en ratas con dieta alta en grasa. También parece que los niveles en hígado no afectan a los observados en plasma.

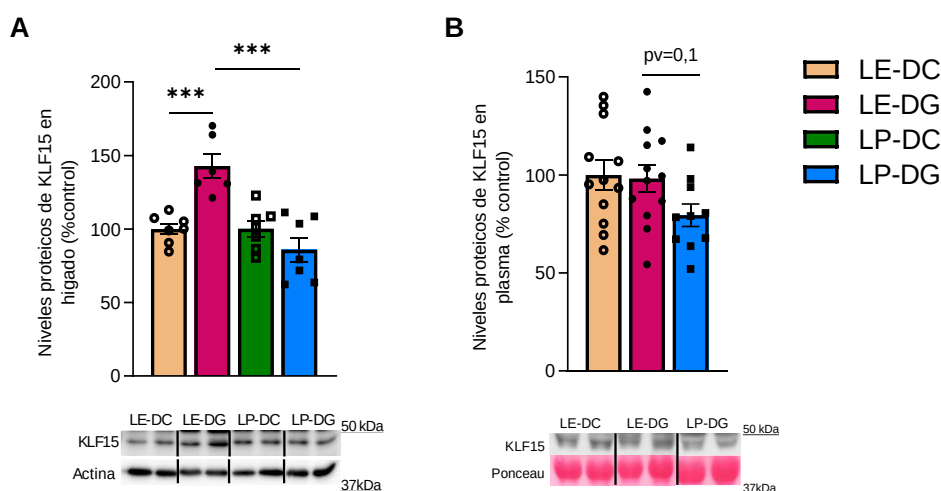


Figura 14. Niveles de KLF15 en (A) tejido hepático y (B) plasma. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

Al continuar analizando los niveles de KLF15 en los modelos de lactancia prolongada a tiempos cortos (Figura 8), pudo observarse un aumento significativo tanto en hígado como en plasma (Figura 15A y B). Para comprobar si este aumento podía ser debido a la semana adicional de vida que tienen las ratas con lactancia prolongada, se hizo un experimento con ratas de diferentes edades de vida, para comprobar cómo se regula KLF15 en hígado con la edad. Hasta la 6ª semana de vida no se detectan diferencias en los niveles de KLF15, y en la 8ª semana presenta niveles significativamente inferiores a todas las anteriores semanas (Figura 14C). Con estos resultados, no parece que la diferencia en KLF15 entre ratas destetadas a las 3 y 4 semanas se deba a la edad, si no a la lactancia.

En cuanto a las ratas con 5 semanas de vida, expuestas a dieta alta en grasa 1 semana, no presentan cambio alguno en sus niveles tanto hepáticos de KLF15, como plasmáticos (Figura 14D y E). Parece así que los niveles disminuidos de KLF15 que se observan en las ratas adultas con obesidad inducida por dieta no ocurren hasta, por lo menos, después de las 5 semanas de vida, además, a edad más temprana y con dieta control, la lactancia prolongada regula KLF15 justo al revés, aumentando sus niveles.

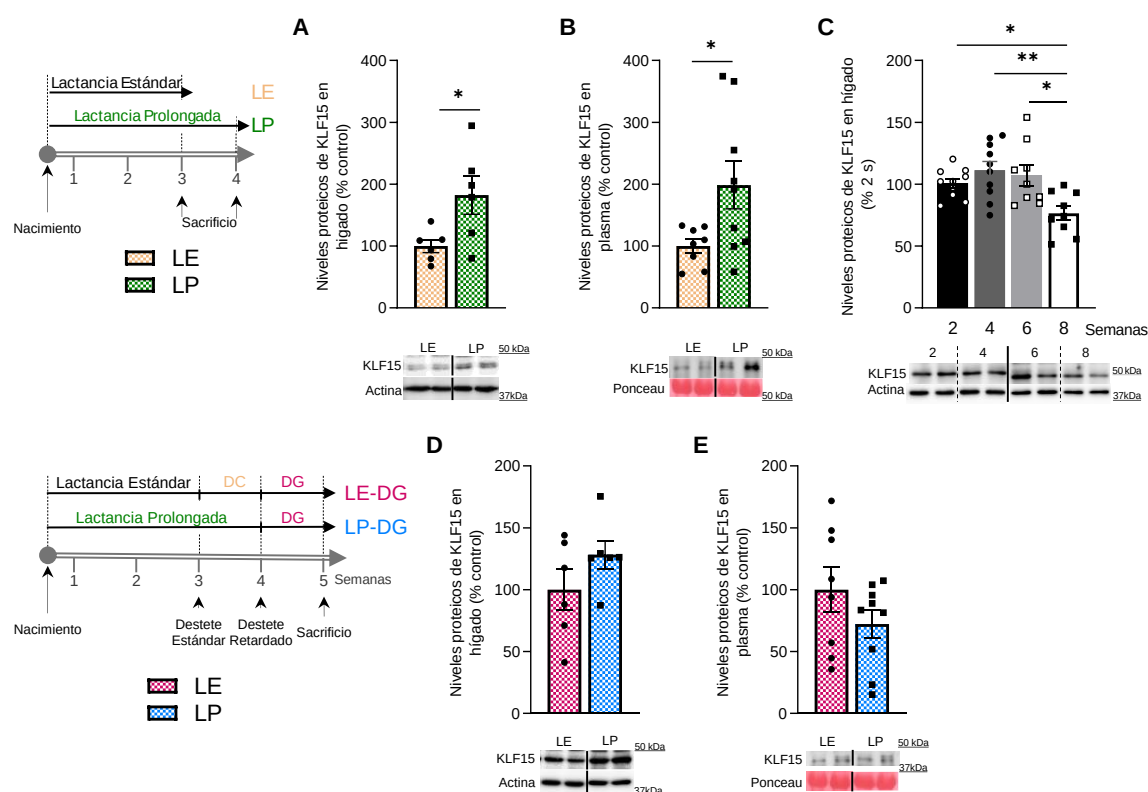


Figura 15. Estudio de KLF15 en ratas jóvenes. Niveles de KLF15 en animales recién destetados en (A) hígado y (B) plasma. (C) Niveles de KLF15 en hígado de ratas 2, 4, 6 y 8 semanas de vida. Niveles de KLF15 en (D) hígado y (E) plasma de ratas con 5 semanas de vida y 1 semana de dieta alta en grasa. Datos representados como media $\pm$ SEM. Diferencias significativas indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Incluidas imágenes representativas de WB; la línea continua indica un corte de la imagen, la línea de puntos la separación de grupos. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

6 Análisis proteómico del modelo de lactancia prolongada

El objetivo del análisis proteómico del modelo de lactancia prolongada fue el de estudiar la existencia de dianas metabólicas específicamente en el plasma, teniendo en cuenta que las encontradas en hígado por RNA-seq no aparecieron modificadas a este nivel. Se analizaron muestras plasmáticas del grupo de lactancia estándar y dieta alta en grasa y de lactancia prolongada y dieta alta en grasa, para así conocer qué efecto produce la lactancia prolongada en ratas con obesidad inducida por dieta en las proteínas plasmáticas.

Se pudieron identificar con este método un total de 152 proteínas. De ellas, 62 estaban modificadas significativamente, con un valor p menor a 0.05, 53 tenían niveles plasmáticos más bajos con la lactancia materna, y 9 más altos. En la Figura 16A pueden verse todas las proteínas identificadas y las clasificadas como modificadas significativamente. Este gráfico de dispersión muestra como la mayoría de las proteínas tienen sus niveles regulados a la baja por la lactancia prolongada, con un $\log FC$ menor a 0. Este hecho también se puede observar en el mapa de calor mostrado en la Figura 16C.

El análisis de componentes principales (Figura 16B) indica, de forma inesperada, una alta variabilidad entre las muestras de lactancia estándar y dieta alta en grasa, y una mejor agrupación entre las muestras del grupo de lactancia prolongada. Es también notable que el primer componente explique el 99.1 % de la variabilidad entre los grupos, esto se debe a que

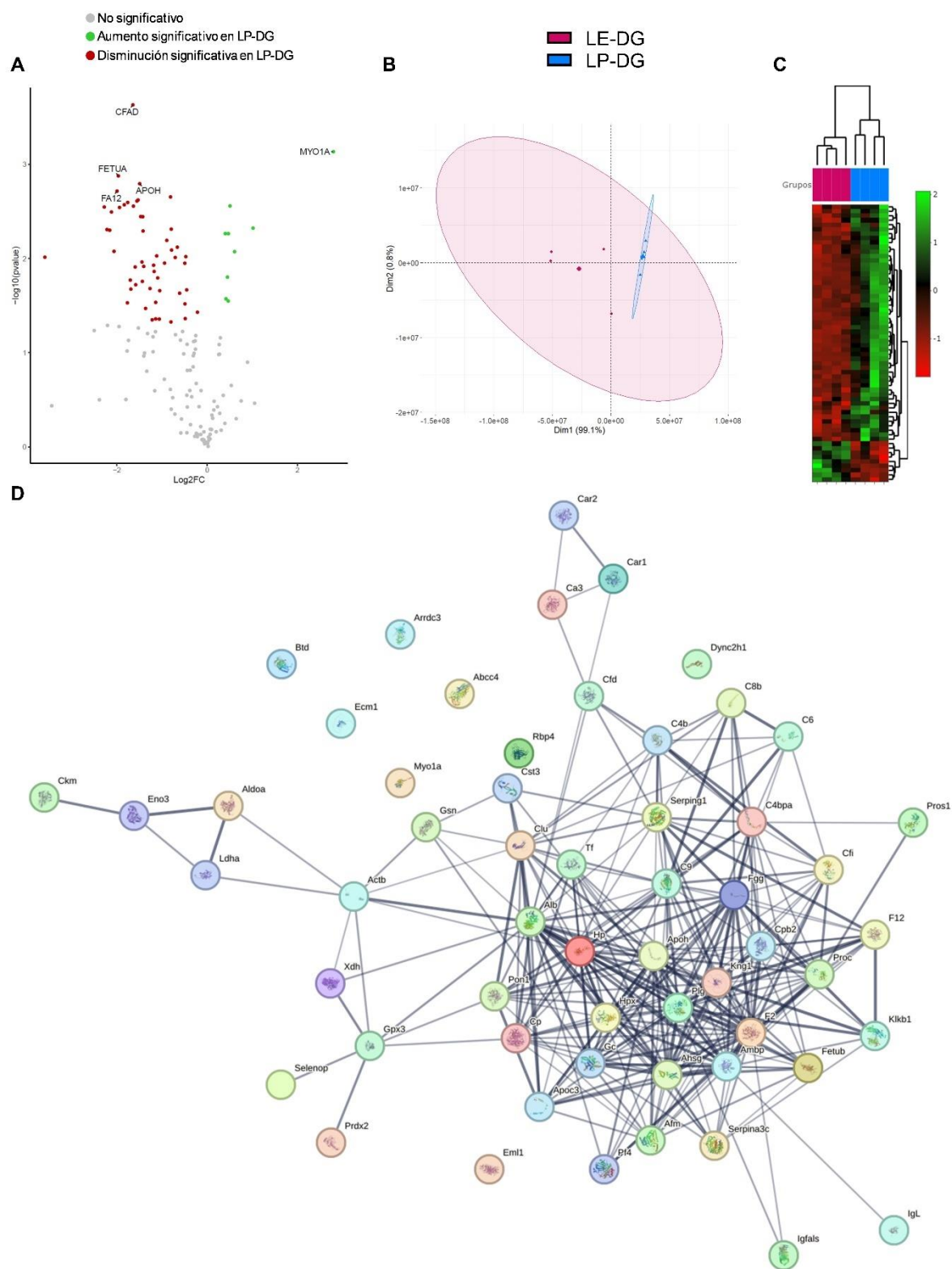
un amplio conjunto de proteínas es regulado a la baja por la lactancia prolongada y diferencia por sí solo los dos grupos experimentales.

Se consiguieron identificar en la base de datos de STRING 57 proteínas de las 62 modificadas significativamente. Al realizar el análisis de interacciones de estas proteínas (Figura 16D) se refuerza la idea de que un amplio grupo de proteínas están siendo modificadas conjuntamente. Se puede observar un nodo de múltiples interacciones entre la mayoría de las proteínas identificadas, se trata de veinte veces más interacciones de las esperadas por azar.

Para el análisis de sobrerrepresentación de los términos de GO se utilizaron todas las proteínas identificadas por proteómica como fondo o universo propio. Partiendo de las 152 proteínas totales, se consiguieron identificar en la base de datos 118 de sus genes precursores, de las 52 proteínas significativas se identificaron 47 genes. Ninguna de las funciones sobrerrepresentadas baja de un valor p ajustado de 1, es decir, ninguna se puede clasificar como significativa con un nivel de confianza del 95 %. Sin embargo, para poder continuar con el análisis, se incluyeron en el estudio todas las rutas que tuvieran un valor p igual o inferior a 0.075. De esta forma, se pudo hacer un estudio de las 36 funciones más enriquecidas, aunque no se tratara de funciones significativas. Todas estas funciones se encuentran detalladas en la Tabla 26.

En la Figura 17A se muestra un resumen del análisis de enriquecimiento aglomerando las funciones por su similitud. Se puede ver un primer grupo de funciones asociadas a la estructura anatómica; la mayor parte enfocadas específicamente al hueso, otro grupo asociado al desarrollo gonadal masculino, y un tercer grupo que también tiene una parte asociada al desarrollo anatómico; esta vez del cerebro, y una parte asociada al estrés. Las funciones que se agrupan en el cuarto lugar de esta Figura se refieren al metabolismo de nucleótidos, y el último de los cúmulos de funciones agrupa todas aquellas relacionadas con la hemostasis.

En la Figura 17B se pueden observar los términos con más significancia y con mayor ratio de genes, y en la Figura 17C y D una selección de funciones asociadas a sus genes correspondientes significativamente modificados por proteómica.



Nº proteínas	Nº interacciones	Grado medio de las proteínas	Coefficiente de clustering local	Nº interacciones esperados	Valor p
57	278	9,75	0,567	13	<0,001

Figura 16. Análisis proteómico en plasma de ratas LE-DG y LP-DG. (A) Diagrama de dispersión del cambio de los niveles en todas las proteínas identificadas. FC: fold change. Diferencia significativa establecida en valor p

< 0.05. (B) Análisis de Componentes Principales, el símbolo más grande marca la media de cada grupo. (C) Mapa de calor de las proteínas con niveles modificados. (D) Análisis de interacción de las proteínas con niveles modificados, en la tabla inferior se resumen el análisis estadístico de las interacciones encontradas. LE: lactancia estándar. LP: lactancia prolongada. DG: Dieta grasa. DC: Dieta control.

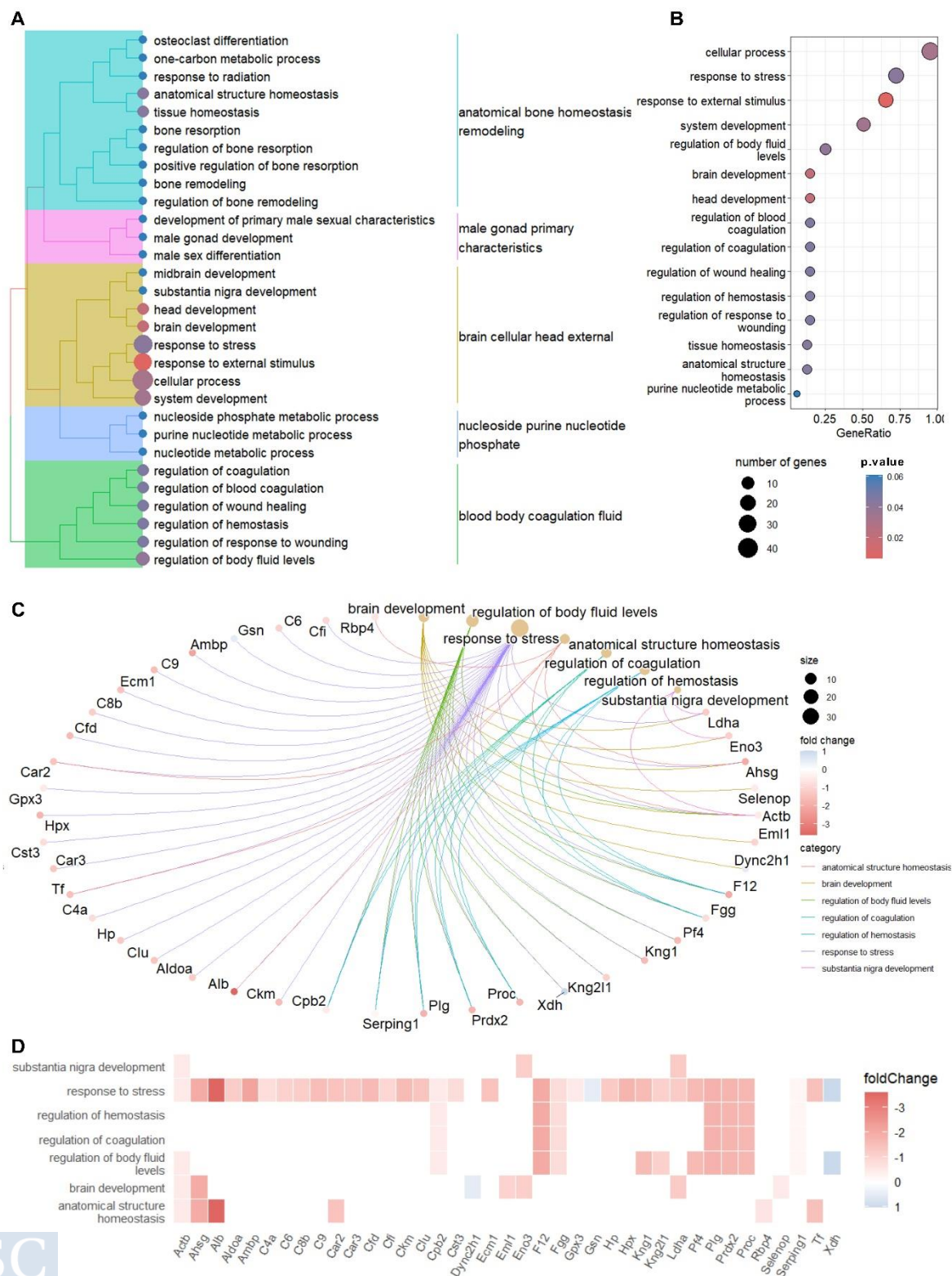


Figura 17. Resultados del análisis funcional de todas las proteínas modificadas significativamente por proteómica de ratas con dieta alta en grasa y lactancia estándar y dieta alta en grasa y lactancia prolongada. (A) Principales funciones enriquecidas (valor $p < 0.75$) agrupadas por similitud. (B) Funciones modificadas con un valor $p < 0.75$ con mayor ratio de genes (genes modificados que pertenecen a esa función / todos los genes modificados e identificados). (C) Selección de funciones enriquecidas con un valor $p < 0.75$ y los genes modificados asociados a ellas. (D) Mapa de calor con los genes y funciones de la Figura C mostrando su asociación y cambio de expresión; azul indica mayor expresión y rojo menor.

Tabla 26: Funciones enriquecidas significativamente entre las proteínas modificadas del análisis proteómico

ID	Descripción	Ratio	p-adj
GO:0009605	response to external stimulus	31/47	0.006295
GO:0007420	brain development	7/47	0.02013
GO:0060322	head development	7/47	0.02013
GO:0009987	cellular process	45/47	0.032221
GO:0048731	system development	24/47	0.033352
GO:0050878	regulation of body fluid levels	12/47	0.03933
GO:0006950	response to stress	34/47	0.042517
GO:0001894	tissue homeostasis	6/47	0.04301
GO:0060249	anatomical structure homeostasis	6/47	0.04301
GO:0030193	regulation of blood coagulation	7/47	0.045949
GO:0050818	regulation of coagulation	7/47	0.045949
GO:0061041	regulation of wound healing	7/47	0.045949
GO:1900046	regulation of hemostasis	7/47	0.045949
GO:1903034	regulation of response to wounding	7/47	0.045949
GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	3/47	0.060749
GO:0006730	one-carbon metabolic process	3/47	0.060749
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	3/47	0.060749
GO:0008584	male gonad development	3/47	0.060749
GO:0009117	nucleotide metabolic process	3/47	0.060749
GO:0009314	response to radiation	3/47	0.060749
GO:0021762	substantia nigra development	3/47	0.060749
GO:0030316	osteoclast differentiation	3/47	0.060749
GO:0030901	midbrain development	3/47	0.060749
GO:0045124	regulation of bone resorption	3/47	0.060749
GO:0045453	bone resorption	3/47	0.060749
GO:0045780	positive regulation of bone resorption	3/47	0.060749
GO:0046546	development of primary male sexual characteristics	3/47	0.060749
GO:0046661	male sex differentiation	3/47	0.060749
GO:0046849	bone remodeling	3/47	0.060749
GO:0046850	regulation of bone remodeling	3/47	0.060749
GO:0048857	neural nucleus development	3/47	0.060749
GO:0007596	blood coagulation	11/47	0.067907
GO:0007599	Hemostasis	11/47	0.067907
GO:0042060	wound healing	11/47	0.067907

GO:0050817	Coagulation	11/47	0.067907
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	11/47	0.067907

Ratio = genes modificados asociados a la función / genes modificados totales

p-adj = valor p ajustado según Benjamini-Hochberg

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha intentado profundizar en el estudio del papel de la lactancia materna sobre distintas patologías, entre ellas la obesidad. La mayoría de los trabajos publicados hasta el momento al respecto son estudios epidemiológicos y muchos de ellos no han obtenido resultados concluyentes (177,188,189,194,202–205). Con el fin de evitar los factores de confusión que limitan los resultados obtenidos de este tipo de estudios, nuestro grupo ha diseñado un modelo preclínico de lactancia prolongada en animales de experimentación. El modelo de lactancia prolongada desarrollado por nuestro grupo ha permitido identificar un efecto metabólico beneficioso del retraso del destete mediado por una proteína hepática, FGF21, como responsable en la activación de la termogénesis a través de su efecto en el SNC (41).

A la luz de estos hallazgos, nuestra hipótesis de partida es que existen múltiples factores a nivel hepático y circulante modificados por la lactancia prolongada y que pueden estar mediando algún mecanismo responsable del efecto protector en la obesidad. Con el fin de confirmar esta hipótesis, hemos realizado estudios de secuenciación masiva de tejido hepático y proteómica de plasma de nuestro modelo para llegar a una selección de proteínas candidatas y detallar su funcionalidad en el modelo. Se pretende así abrir nuevas vías de investigación que puedan aportar información sobre los mecanismos por los cuales la lactancia prolongada protege contra la obesidad, examinar si las proteínas modificadas podrían funcionar como dianas terapéuticas para la obesidad, y aportar información para aclarar la controvertida asociación entre mayor tiempo de lactancia y menor riesgo de obesidad en humanos.

El análisis de secuenciación del transcriptoma (RNA-seq) de tejido hepático ha revelado que la lactancia prolongada modifica el perfil de expresión hepático en ratas con obesidad inducida por dieta. De entre los genes identificados, 199 presentan modificaciones significativas en su expresión. Su alto grado de interacción y el enriquecimiento en 24 funciones sugieren que no se trata de una regulación de expresión genética azarosa, si no que existen grupos amplios de genes modificados que cumplen funciones específicas.

De entre los genes con mayor nivel de modificación se encuentra *One Cut Homeobox 1* (*OneCut1*), cuya expresión es 16 veces menor en las ratas con lactancia prolongada que en ratas lactancia estándar. Se trata de un factor de transcripción que en nuestro análisis aparece asociado a la función denominada “procesos metabólicos de la glucosa” por ser regulador de PFKFB3, una enzima asociada tanto a la síntesis como a la degradación de la fructosa-2,6-bisfosfato, y por tanto a la glucólisis (206). ONECUT1 queda también asociado al metabolismo de la glucosa al ser un estimulador de la transcripción de la glucoquinasa en el hígado (207), y al describirse recientemente que ciertas variantes del gen podrían estar relacionadas con la diabetes (208), lo que concuerda con sus funciones en el desarrollo del páncreas (209). Además, estudios in vitro han demostrado que ONECUT1 hepático antagoniza las acciones de los glucocorticoides y su estimulación de la transcripción del gen *Pepck* (210) y de su acción estimulante de la gluconeogénesis. Al estar ONECUT1 disminuido en la lactancia prolongada, se esperaría que estos animales tuvieran mayor expresión de *Pepck*, y efectivamente en el análisis RNA-seq este gen aparece significativamente aumentado. Retomaremos el estudio de este gen más adelante con relación a KLF15.

Socs2 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 2*) es otro de los genes con mayor reducción de expresión en ratas con lactancia prolongada. En nuestro análisis de enriquecimiento funcional este gen se asocia a la “respuesta celular a estímulos hormonales” porque ha sido descrito como mediador en la inhibición que los estrógenos provocan sobre la hormona de crecimiento en humanos (211). Otra de las funciones enriquecidas en el modelo a la que pertenece *Socs2* es el “desarrollo del alvéolo de la glándula mamaria”, por su regulación inhibitoria de la señalización de la prolactina, y por lo tanto de la expansión y diferenciación de la glándula mamaria durante

el embarazo (212). Cabe mencionar que *Socs2* ha sido descubierto como un posible gen crítico en la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica, y el carcinoma hepatocelular (213). Por lo que su disminución con la lactancia prolongada podría implicar una posible protección contra estas enfermedades.

La *Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 2* o *Hsd17b2*, es una enzima que presenta 5 veces más expresión en ratas con lactancia prolongada. Su función es la de convertir los 17 β -hidroxiesteroides altamente activos, como el estradiol, la testosterona y la dihidrotestosterona, en sus formas cetónicas inactivas (214). Ha sido descrita una disminución en sus niveles de expresión hepática en mujeres con enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica o MASLD (215), puede que su elevación por la lactancia prolongada suponga un factor de protección.

Por último, también es interesante hablar del gen *Nr1d1*, el receptor nuclear subfamilia 1 grupo D miembro 1, muy relacionado con la regulación del ciclo circadiano, pero también con el metabolismo energético. Su deficiencia junto con la de *Nr1d2* se relaciona con esteatosis hepática (216,217), y predispone a la obesidad inducida por dieta (218). La elevación de su expresión en nuestro modelo podría indicar que se trata de otra de las vías por la que la lactancia prolongada protege contra la obesidad.

Además del estudio de los genes modificados en el RNA-seq, en este trabajo nos hemos centrado en el estudio funcional, para identificar las funciones con la que los genes modificados están significativamente relacionados. De este análisis hemos identificado el ritmo circadiano como una de las funciones enriquecidas. Se trata de un sistema que mantiene la sincronía de comportamiento y fisiología de un organismo con los ciclos ambientales de 24 horas, y aunque su desarrollo comienza en el útero, continúa tras los primeros años de vida, y se conoce que las hormonas procedentes de la leche materna juegan un papel importante (219). Otra importante función modificada en nuestro modelo es la inmunitaria. La relación entre la lactancia materna y la inmunidad del lactante se conoce desde mediados del siglo pasado al descubrir la presencia de anticuerpos en la leche (220–222). Sin embargo, el estudio RNA-seq revela una forma específica por la que el tiempo de lactancia podría estar modulando la respuesta inmunitaria en el lactante a largo plazo; a través de la modificación de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad, es decir, aquellos genes que codifican los antígenos leucocitarios humanos, que participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T (223).

Han sido 3 los genes modificados por RNA-seq cuyas características nos han llevado a seleccionarlos para su estudio; su asociación con múltiples funciones relacionadas con el metabolismo energético, en el caso de *Angptl4* y *Klf15*, o con otras proteínas muy estudiadas en el campo, en el caso de *Banp*. A pesar de que el RNA-seq es una técnica muy utilizada para el análisis del transcriptoma completo, ha mostrado pequeñas discordancias al comparar sus medidas de expresión con las de la PCR cuantitativa a tiempo real. Aunque estos efectos parecen afectar solo a genes pequeños, con poca expresión o poca diferencia de expresión (224), hemos querido realizar la validación por PCR para asegurarnos resultados coherentes. De hecho, uno de los genes seleccionados; *Banp*, ha mostrado discrepancias entre ambas técnicas, lo que nos ha llevado a paralizar su estudio. Un análisis sobre sus empalmes alternativos y nuevas validaciones con diferentes cebadores podrían ayudar a entender esta discrepancia. Este proyecto continúa con la apertura de vías de estudio de las proteínas cuya expresión se ve modificada por la lactancia prolongada en ratas con dieta alta en grasa tanto por RNA-seq como por PCR; ANGPTL4 y KLF15.

ANGPTL4 actúa como factor inhibidor de LPL, y de esta forma reduce la internalización de triglicéridos en el tejido adiposo. Aunque su función en el hígado esté menos explorada, sus niveles de expresión son elevados, y ello lleva a suponer cierta funcionalidad. En nuestro

estudio, hemos comprobado que la lactancia materna modifica la expresión de esta proteína tanto por RNA-seq como por PCR, lo que nos lleva a analizar sus niveles proteicos para verificar esta regulación.

En este trabajo nos centramos en el estudio de la forma completa monomérica de ANGPTL4, de 50 kDa, precursora de la forma oligomérica completa y escindida, ambas con capacidad de inhibir a LPL. También se debe tener en cuenta que se estará incluyendo en el análisis formas que estaban en estado oligomerizado, pero que sus puentes disulfuro han sido rotos por los componentes reductores de la técnica del Western Blot. En ambos casos se tratará de formas de ANGPTL4 previas a su escisión, que se produce extracelularmente y no parece ser necesaria para la inhibición de LPL (73).

Al igual que la expresión, los niveles de ANGPTL4 en hígado de ratas con dieta alta en grasa están disminuidos por la lactancia prolongada, coincidiendo con menor peso corporal, menores niveles de triglicéridos, mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina (41). En estudios previos se indica que es poco probable que ANGPTL4 hepático tenga relación con los niveles de triglicéridos en sangre (88), pero su silenciamiento en hígado está asociado con la mejora del perfil glucémico tras la administración crónica de una dieta alta en grasa (88,93). La prolongación de la lactancia provoca una disminución en sus niveles hepáticos y de esta manera podría estar participando en la mejora del metabolismo de la glucosa que se observa en el modelo. Es interesante el hecho de que la regulación de ANGPTL4 por la lactancia prolongada no se encuentra en fases tempranas del modelo; ni en el momento del destete ni tras una semana de dieta alta en grasa, a pesar de observarse ya el efecto protector de la lactancia prolongada tanto en peso como en masa grasa. Podríamos suponer entonces que esta regulación es tardía, y no parece responsable del efecto beneficioso temprano que tiene la lactancia prolongada, aunque si pudiera serlo a largo plazo.

Al contrario que la regulación de ANGPTL4 por ayuno y realimentación, la regulación de ANGPTL4 por dieta alta en grasa no está del todo aclarada. En el análisis del modelo encontramos que ANGPTL4 aumenta en hígado tras la administración de dieta alta en grasa. Sin embargo, Spitler et al. vieron disminuida su expresión tras 3 y 6 meses de dieta alta en grasa (117,119). La explicación para estas discordancias podría residir en ciertas diferencias experimentales, nuestra dieta alta en grasa contiene menor porcentaje graso (40 % Kcal de grasa en comparación con 60 % Kcal), la exposición a la dieta alta en grasa es más temprana (en el momento del destete en comparación con 8 semanas de vida), y se trata de especies de estudio distintas (rata y ratón). Por otro lado, también se debe tener en cuenta que Spitler et al. miden expresión génica y nosotros nivel proteico, lo que podría no coincidir.

Es llamativo que los niveles de ANGPTL4 en hígado aumenten con la dieta alta en grasa en ratas con lactancia estándar, y sin embargo disminuyan con la misma dieta en ratas con lactancia prolongada. Esta regulación distinta de ANGPTL4 por la dieta dependiendo de la lactancia podría estar sugiriendo cambios profundos provocados por la lactancia, que no se desarrollan hasta que el organismo es puesto a prueba con una dieta alta en grasa a largo plazo.

Los niveles plasmáticos de ANGPTL4 no parecen verse afectados por la lactancia prolongada, sugiriendo que el hígado no aporta ANGPTL4 al sistema circulatorio. Tampoco encontramos modificaciones por dieta alta en grasa, lo que no concuerda ni con el aumento encontrado en humanos con obesidad (89,90) ni con el descenso que se ha encontrado en ratones con obesidad (66). Teniendo en cuenta la rápida regulación de ANGPTL4 ante el ayuno y su regulación circadiana, es posible que el momento de la toma de muestras sea clave para poder comparar estos resultados. Son necesarios más estudios sobre el comportamiento de ANGPTL4 en la obesidad, tanto en los diferentes tejidos como a nivel circulatorio.

Resultados previos de nuestro grupo con este modelo encontraron que FGF21 hepático actúa en el LHA para regular la termogénesis. La falta de relación entre los niveles hepáticos y los plasmáticos de ANGPTL4 descarta que este sea su mecanismo de actuación, pero su expresión y la de LPL en el cerebro podrían significar cierta funcionalidad a ese nivel. Nuestros resultados han revelado, por vez primera, que existe expresión de ANGPTL4 específicamente en el LHA, y que sus niveles proteicos están modificados tanto por la dieta alta en grasa, como por la lactancia prolongada. Existe una reducción de ANGPTL4 en dieta alta en grasa que revierte cuando las ratas recibieron también lactancia prolongada. En nuestro caso, mayores niveles de ANGPTL4 central no se correspondieron con anorexia, como encontraron otros autores tras su inyección ICV (101), aunque quizás los niveles que pueda alcanzar ANGPTL4 por inyección ICV en LHA no sean comparables a los que pueda estimular la lactancia prolongada de forma fisiológica. Sin embargo, el aumento de ANGPTL4 tanto por lactancia prolongada como por inyección ICV se acompaña de menor peso corporal y mayor termogénesis (27)., por lo que existe la posibilidad de que ANGPTL4, a través de su regulación en el LHA, esté mediando en estos efectos.

Los niveles de LPL en el LHA también se regulan por la dieta y la lactancia prolongada de forma coherente con ANGPTL4; aumentan en dieta alta en grasa, cuando ANGPTL4 disminuye, y vuelven a disminuir con la lactancia cuando ANGPTL4 aumenta. Este hecho abre la posibilidad de que ANGPTL4 también provoque la inhibición de LPL en el SNC. El silenciamiento de LPL en neuronas provoca hiperfagia y obesidad (105), lo que sugiere un papel regulador del apetito, sin embargo, nuestros resultados apuntan que en obesidad sus niveles en el hipotálamo lateral aumentan. Esto podría indicar una regulación diferencial en las distintas áreas del cerebro o una resistencia, disfunción o respuesta compensatoria en la obesidad.

Basándonos en el papel ya descrito de FGF21 sobre la regulación del gasto energético a través de neuronas dopaminérgicas del LHA (41), y en que los niveles hipotalámicos de ANGPTL4 presentan un patrón similar al de FGF21, hemos querido indagar sobre la posibilidad de una interacción entre ambas proteínas. El FGF21 circulante tiene capacidad de alcanzar el hipotálamo para realizar sus funciones sobre el metabolismo (41,225–227). Sin embargo, esto no puede suceder para ANGPTL4, ya que sus niveles en circulación no se ven modificados de igual manera por la dieta y la lactancia que en LHA, lo que sugiere que el ANGPTL4 que se encuentra en LHA no procede de la circulación. Teniendo en cuenta que los niveles de ANGPTL4 en hipotálamo tras la inyección ICV de FGF21 sufren un aumento a las 8 horas de la inyección, hemos planteado como hipótesis que FGF21 regula los niveles de ANGPTL4 en el hipotálamo. Esta relación positiva entre niveles de FGF21 y ANGPTL4 hipotalámicos va acorde a los niveles encontrados de ambas proteínas en dieta alta en grasa y lactancia prolongada. Además, los resultados de la inhibición hepática de FGF21 corroboran que es el FGF21 de origen hepático el responsable de regular los niveles de ANGPTL4 en hipotálamo, ya que su silenciamiento en hígado provoca no solo la disminución del propio FGF21 en hipotálamo, sino también de ANGPTL4. Además, el estudio sobre LPL reconfirma sus resultados anteriores ya que sigue un patrón completamente opuesto a ANGPTL4 sugiriendo que está siendo regulada por esta proteína.

Estos resultados indican que FGF21 hepático puede regular los niveles de ANGPTL4 en LHA, describiendo así, por vez primera, la interacción de FGF21 y ANGPTL4 a nivel central. La hipótesis que planteamos en este punto es que ANGPTL4, a través de LPL, es un mediador para los efectos que FGF21 provoca sobre la termogénesis.

Por otra parte, nuestros estudios continúan ahondando en la regulación de *Klf15*, otro de los genes modificados por RNA-seq y asociados a múltiples funciones del metabolismo energético enriquecidas en nuestro modelo. KLF15 destaca por su papel como regulador clave

de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, por ello decidimos investigar más profundamente su comportamiento en este modelo para explorar su relación con la obesidad inducida por dieta y la lactancia prolongada.

El análisis de KLF15 en los diferentes tejidos muestra la presencia de la proteína en hígado, grasas, intestino, LHA y mucosa gástrica. Es revelador el bandeo que muestra KLF15, posiblemente fruto de modificaciones postranscripcionales ya conocidas, como los son empalmes alternativos específicos para hígado y músculo (228), y quizás también de modificaciones postraduccionales. De particular interés es la banda de 37 kDa, que está presente en todos los tejidos y sugiere una posible isoforma de KLF15, mientras que la forma más ligera, por debajo de los 25 kDa, solo está ausente en los tejidos grasos, lo que podría indicar una regulación específica por tejido. En nuestro trabajo nos hemos centrado en estudiar la forma de 50 kDa, ya que la predicción de su masa molecular es de 44 kDa.

En esta tesis se muestra por vez primera la presencia de la proteína KLF15 en leche. Este resultado junto a su localización previa en glándulas mamarias (51) podrían indicar que la proteína se esté filtrando a la leche y siendo transferida a las crías durante la lactancia. Los resultados en ratas de 3 y 4 semanas sacrificadas tras el destete concuerdan con esta hipótesis, siendo las ratas con lactancia prolongada las que presentaron mayores niveles de KLF15 en plasma. Teniendo en cuenta que no encontramos diferencias entre ratas control de 2 y 4 semanas de edad, este ascenso en los niveles solo se puede deber al factor de la lactancia. Serían necesarios experimentos de trazado molecular para comprobar si el KLF15 procedente de la leche llega al plasma de la cría, o si este aumento en sus niveles se debe a la aportación de otros tejidos, como por ejemplo el hepático, en el que también vemos mayores niveles. Aunque hemos encontrado que en leche humana los niveles de KLF15 aumentan con el tiempo de lactancia, no hemos visto esta modificación en la leche de rata. Aun así, se debe considerar que, aunque los niveles de KLF15 sean iguales en la semana 3 que en la semana 4 de lactancia, las crías con lactancia prolongada cuentan con mayor tiempo de exposición a KLF15, lo que podría ser suficiente para aumentar sus niveles plasmáticos. Otro punto que aclarar es la función que puede tener KLF15 en plasma, ya que se trata de un factor de transcripción que actúa, hasta donde se conoce, en el núcleo de las células (229). Nuestros resultados sugieren que el efecto estimulador de la lactancia prolongada sobre los niveles de KLF15 hepático en una dieta control se pierde en la edad adulta, no encontrando diferencias entre ratas LE-DC y LP-DC. Este hecho no es incompatible con la hipótesis de que KLF15 participe en la programación metabólica temprana de las ratas, donde la lactancia influye en el metabolismo hepático.

Nuestros estudios en ratas adultas aportan información para la caracterización de KLF15 hepático en obesidad. Las ratas sometidas a dieta alta en grasa tienen unos niveles de KLF15 en hígado aumentados, oponiéndose al menor nivel de expresión encontrado en ratones ob/ob (110). Es posible que no se corresponda la expresión con los niveles de proteína, al igual que sucede cuando comparamos ratas LE-DG con LP-DG, o que las ratas con dieta alta en grasa se vuelvan resistentes a estos elevados niveles de KLF15 hepáticos, y este no genere su función inhibitoria de la lipogénesis. Estudios sobre sus mediadores, como SREBP-1c aclararían esta hipótesis. Además, se debe tener en cuenta que el modelo de ratones ob/ob generan una obesidad caracterizada por la deficiencia de leptina, mientras que en la obesidad inducida por dieta presenta niveles elevados de leptina junto a un estado de resistencia a su acción. Interacciones entre KLF15 y leptina, que ya han sido demostradas en el contexto del desarrollo renal (230), también podrían explicar esta falta de concordancia entre modelos.

En ratas con dieta alta en grasa, la lactancia materna provoca una sobreexpresión de KLF15 en hígado, sin embargo, al estudiar los niveles de proteína hemos encontrado una clara disminución. Mientras, en plasma los niveles no parecen modificarse, lo que descartaría una

posible secreción del hígado al sistema circulatorio, por lo menos de esta isoforma específica en ratas adultas. A menudo los resultados de expresión y los niveles de una proteína no concuerdan debido a posibles modificaciones postraduccionales, la inhibición de la traducción o la degradación de la proteína. Más estudios de la regulación de KLF15 a nivel proteico podría aclarar este antagonismo entre ARN mensajero y proteína.

Es destacable que el efecto de la lactancia materna sobre los niveles proteicos de KLF15 sea transitorio y dependiente de la dieta. Como hemos discutido anteriormente, en el momento del destete KLF15 está aumentado con la lactancia prolongada, y este efecto desaparece con la edad. También parece desaparecer con una semana de dieta alta en grasa, y mayor tiempo de esta dieta implica una reversión de sus niveles. El papel de KLF15 en la obesidad aún no está aclarado, pero en nuestro modelo sus niveles proteicos están aumentados, y la lactancia materna los revierte a sus niveles control, aunque queda por estudiar su funcionalidad.

Se conoce que la inducción de la expresión de *Pck1* que genera KLF15 es importante para su acción estimuladora de la gluconeogénesis en hígado (108,113). En nuestro estudio RNA-seq hemos encontrado que *Pck1* aumenta significativamente de expresión en ratas con LP-DG en comparación con LE-DG. El gen *Pck1*, que codifica para PEPCK-C, es uno de los puntos de control de la gluconeogénesis hepática, su sobreexpresión provoca el incremento de la producción de glucosa (231). Además, PEPCK-C realiza tanto en hígado como en tejido adiposo una importante función; la gliceroneogénesis, esto es, la producción de glucosa 3 fosfato a partir de precursores gluconeogénicos, como el piruvato. La glucosa 3 fosfato es utilizada para esterificar tres acil-CoA grasos y formar una molécula de triglicérido. De esta forma PEPCK-C también regula la liberación de triglicéridos al torrente sanguíneo (232), de hecho, el bloqueo de PEPCK-C en hígado genera acumulación de ácidos grasos no esterificados en este tejido (233). El aumento de expresión de PEPCK-C en nuestras muestras de hígado concuerda con el aumento de KLF15, ambos genes se asocian al aumento de la gluconeogénesis, y mientras KLF15 provoca la disminución la lipogénesis, PEPCK-C provoca la liberación de ácidos grasos en forma de triglicéridos para aportar energía al resto de tejidos.

Aunque algunos trabajos consiguieron demostrar que KLF15 puede activar y sobreexpresar PEPCK-C en cultivos primarios de hepatocitos (108,110), y en modelos de silenciamiento y sobreexpresión en ratones (110) otros no observan una disminución de PEPCK-C cuando inactivan KLF15 hepático (112). Queda por aclarar si KLF15 y PEPCK-C están correguladas, y cuál es el mecanismo de activación.

El objetivo principal de este trabajo es identificar dianas metabólicas modificadas por la lactancia materna prolongada que puedan explicar su efecto protector contra la obesidad, con el fin de explorar su potencial como tratamientos contra esta enfermedad. En nuestros estudios las proteínas ANGPTL4 y KLF15, han mostrado modificaciones significativas a nivel hepático y del sistema nervioso central, tanto por la dieta como por la lactancia prolongada. Estas proteínas son interesantes para su estudio como dianas terapéuticas debido a su papel regulador en el metabolismo, sin embargo, sus funciones dependientes del tejido hacen que su estudio como tratamientos sea más complejo. Lejos de invalidar su relevancia, este hecho resalta la necesidad de una estrategia más precisa y focalizada en su modulación tejido-específica para obtener efectos terapéuticos.

Para complementar estos esfuerzos, hemos decidido ampliar nuestro enfoque y buscar proteínas con un impacto sistémico, que puedan ser moduladas no solo en el hígado, sino también en otros tejidos. Estas proteínas, al estar presentes en el sistema circulatorio, podrían facilitar el desarrollo de tratamientos con efectos generalizados. Para ello, hemos realizado un análisis proteómico del plasma de ratas bajo dos condiciones: lactancia estándar con dieta alta en grasa y lactancia prolongada con la misma dieta. Esta técnica nos permitirá identificar

proteínas circulantes cuyas modificaciones puedan estar asociadas con los efectos protectores de la lactancia prolongada y que, al mismo tiempo, podrían ser más fácilmente estudiadas como dianas terapéuticas a nivel sistémico.

Los resultados del análisis proteómico indican que la lactancia prolongada provoca cambios en la expresión proteica de los animales de nuestro modelo, con una modificación significativa del nivel de expresión de 152 proteínas en plasma. Cabe destacar que esta técnica presenta limitaciones a la hora de cuantificar proteínas que se encuentran en concentraciones muy bajas, por lo que es probable que el número real de proteínas afectadas sea incluso mayor.

La identificación de los genes precursores de las proteínas identificadas en el análisis proteómico reduce el número final de genes para su estudio funcional, lo que disminuye considerablemente la robustez estadística del análisis funcional y podría tener que ver con la falta de resultados significativos. Dado que nuestro propósito es abrir nuevas líneas de estudio que requerirán validaciones adicionales en el futuro, hemos considerado que no es imprescindible aplicar un umbral de significancia estricto en esta fase exploratoria. Para continuar investigando las funciones asociadas a las proteínas modificadas en este modelo, hemos optado incluir en el estudio funciones con un valor p menor a 0.075. Si bien este enfoque conlleva un nivel de confianza estadística considerablemente menor, nos proporciona una visión que abarca mayor número de áreas funcionales potencialmente afectadas, lo que resulta útil para orientar futuras investigaciones.

Existe un bloque de funciones enriquecidas asociadas a la regulación de la hemostasis. Sus proteínas asociadas, como factores de coagulación, el fibrinógeno o el plasminógeno están disminuidas en las ratas con lactancia prolongada. Es ya conocido que la obesidad está asociada con un sistema hemostático alterado, lo que incluye una acentuada activación de las plaquetas (234), mayores concentraciones y actividad de los factores de coagulación y menor fibrinólisis (235,236). Las personas con obesidad, por ejemplo, tienen mayores niveles de fibrinógeno (237,238), incluso desde la adolescencia, lo que implica mayor riesgo de aterogénesis y trombogénesis, y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (239). Es posible, por tanto, que las funciones asociadas a la homeostasis que aparecen alteradas en las ratas con lactancia prolongada sean en realidad el resultado de la reducción de su nivel de obesidad.

En el bloque de funciones relacionadas con el metabolismo de los nucleósidos nos encontramos tres funciones anidadas; los procesos metabólicos de nucleósidos fosfato engloban a los procesos metabólicos de nucleótidos, y estos a su vez al proceso metabólico de nucleótidos de purina. Este proceso se refiere a las rutas y reacciones químicas involucradas en la síntesis, degradación y regulación de los nucleótidos que contienen bases nitrogenadas del tipo purina, como la adenina y la guanina. Estos nucleótidos de purina, como el ATP (adenosín trifosfato) y el GTP (guanosina trifosfato), son fundamentales para procesos biológicos clave, como el almacenamiento y transferencia de energía, la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y la señalización celular. Este proceso es esencial para mantener el balance de energía celular, la replicación del ADN y el correcto funcionamiento del ciclo celular. La enzima LDHA o lactato deshidrogenasa se encuentra disminuida por la lactancia prolongada y asociada a estas funciones. Este subtipo de la enzima LDH cataliza la conversión de piruvato en lactato, mientras que el subtipo B cataliza la reacción contraria. Se trata de una proteína muy estudiada por su papel en las infecciones, tumores y enfermedades autoinmunes y se ha asociado a mayor capacidad antiinfecciosa e inmunidad antitumoral (240). Otra enzima disminuida por la lactancia prolongada es ALDOA, o fructosa-bisfosfato aldolasa, clave en la regulación del flujo glucolítico. Recientemente, se han asociado variantes de cambio de sentido de este gen a la obesidad severa de inicio temprano (241), lo que sugiere un posible papel en la obesidad. Estas

proteínas están asociadas a las mismas funciones, y sus modificaciones podrían estar implicadas en el mejor perfil metabólico que presentan las ratas con dieta alta en grasa.

Aunque hayan sido encuadradas en un mismo grupo por la similitud de los términos, es necesario analizar independientemente las funciones relacionadas con el desarrollo y la respuesta a estímulos, y las relacionadas con el desarrollo cerebral. Funciones como “procesos celulares” y “desarrollo de sistemas” abarcan 45 proteínas que participan en procesos muy básicos de mantenimiento y maduración celular. Asimismo, las funciones relativas a la respuesta al estrés y estímulos externos incluyen una amplia variedad de estresores, como hipoxia, calor, estrés oxidativo y psicosocial, y estímulos como mecánicos, bióticos y lumínicos. Estas categorías son excesivamente amplias y generalistas para su estudio, abarcan proteínas involucradas en procesos muy diversos lo que dificulta la identificación de rutas específicas modificadas en nuestro modelo.

Las funciones asociadas al desarrollo del cerebro, como ha pasado con otras funciones, están consecutivamente anidadas. La más específica de ellas es el desarrollo de la sustancia negra. Esta área del cerebro es uno de los núcleos que constituye el circuito de los ganglios basales, el cual controla los movimientos voluntarios, el sistema de recompensa y de adicción (242). Se trata de una zona muy vinculada a la enfermedad del Parkinson, ya que las neuronas dopaminérgicas de esta zona están especialmente afectadas en esta enfermedad (243). Cambios en la sustancia negra también se han asociado con otras enfermedades como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la Esclerosis múltiple (242). A esta función se le asocian dos proteínas cuyos niveles disminuyen con la lactancia prolongada: la LDHA, ya mencionada anteriormente y la ENO3, una enolasa más conocida por su función en el desarrollo del músculo esquelético. En la sustancia negra, la LDHA se considera una de las enzimas clave en la regulación de la glucólisis y los niveles de lactato. Tanto la sobreexpresión de sus niveles como los del lactato provocan la apoptosis de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (244) en humanos. En cuanto a ENO3, un estudio proteómico ha encontrado sus niveles aumentados en la sustancia negra de pacientes con Alzheimer, Huntington y Esclerosis (245). El hecho de que tanto los niveles plasmáticos de LDHA como de ENO3 sean menores en las ratas con lactancia prolongada podría sugerir un posible papel en la protección de estas enfermedades neurodegenerativas para la lactancia prolongada.

El grupo de funciones relacionadas con el desarrollo gonadal incluye tres proteínas: la glicoproteína alfa-2-HS (AHSG), la cistatina C (CST3) y la proteína de unión al retinol 4 (RBP4), las cuales todas están disminuidas por la lactancia prolongada. El estudio de estas tres proteínas en el contexto del desarrollo gonadal no deja claro cuál es el efecto de la lactancia prolongada sobre esta función. Mientras AHSG parece ejercer efectos inhibitorios sobre la morfogénesis de los cordones seminíferos (246), por lo que su reducción ayudaría al desarrollo gonadal, Cystatin C afecta a la espermatogénesis de forma distinta dependiendo de la etapa del ciclo (247) y RBP4 evita la degeneración testicular (248). Serían necesarios estudios más detallados para concluir algún efecto de la lactancia prolongada sobre el desarrollo gonadal.

El último grupo de funciones enriquecidas están asociadas a la homeostasis ósea. Las 4 proteínas asociadas a estas funciones también se encuentran disminuidas por la lactancia prolongada. Por un lado, el factor plaquetario 4 (PFL4) aumenta significativamente durante la diferenciación de los osteoclastos, aunque queda por averiguar si su aumento se debe a otras actividades, como la regulación de la vascularización (249). La transferrina (TF) se ha asociado a la activación de los osteoclastos y al metabolismo del hueso a través de su receptor TfR1 (250). También la anhidrasa carbónica 2 (CAR2) es esencial para la reabsorción del hueso y para la diferenciación de los osteoclastos a través de su regulación del pH intracelular (251,252). Por último, la glicoproteína FETUA, Fetuina-A o AHSG (*α-Heremans-Schmid glycoprotein*)

también es importante para la reabsorción ósea, y sólo es efectiva en la presencia de bajas concentraciones de la hormona paratiroidea (253). Estos resultados sugieren que la disminución que produce la lactancia prolongada sobre estas proteínas podría estar dificultando la reabsorción ósea de estos animales. Aunque la hipertensión, la dislipemia, la disregulación de la glucemia y la obesidad abdominal están asociadas con la osteoporosis, la obesidad parece asociarse a un incremento en la densidad ósea por contar con niveles más altos de 17β -estradiol y de cargas mecánicas (254). Las personas con obesidad parecen tener menores niveles de 25-hidroxi vitamina D, lo que no encaja con su mayor densidad ósea. Esto se explica por el efecto que tiene la leptina sobre las células estromales de la médula ósea, ya que estimula la osteoblastogénesis, y mejora el metabolismo de la vitamina D (255). Esto puede explicar que las ratas con dieta alta en grasa y lactancia prolongada, que tienen menor peso corporal y menores niveles de leptina (41) que aquellas con la misma dieta y lactancia estándar, no cuenten con tanta protección ante la pérdida de masa ósea. Sería necesario comprobar sus niveles de masa ósea para conocer si efectivamente hay mayor reabsorción y se encuentra disminuida.

Tras el análisis funcional de los resultados de proteómica, observamos que la lactancia prolongada no mostró cambios significativos en funciones globales directamente relacionadas con el metabolismo energético. Sin embargo, es importante destacar que sí se identificaron proteínas que de forma individual participan en vías metabólicas energéticas. Estas proteínas, aunque no afectan de forma significativa al conjunto de las funciones de este análisis, podrían desempeñar roles específicos en la regulación del metabolismo energético, lo cual sugiere que podrían estar involucradas en procesos subyacentes relacionados con la obesidad. A continuación, exploraremos algunas de estas proteínas y sus posibles implicaciones.

La enzima ENO3, que vimos asociada a las enfermedades neurodegenerativas, pero parece que también tiene relación con la obesidad y sus comorbilidades. Se ha visto que en pacientes con obesidad mórbida ENO3 está más expresada en el hígado que en pacientes tras una elevada pérdida de peso (256), ha sido identificada como gen clave para la progresión de la MAFLD, aumenta con esta enfermedad y se asocia a un mal pronóstico (257), y en estudios in vitro han demostrado que promueve el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica al inhibir la ferroptosis e incrementar la acumulación lipídica (258). La disminución de los niveles de ENO3 en plasma de ratas con lactancia prolongada podría significar una protección contra estas comorbilidades de la obesidad, aunque son necesarios más estudios que aclaren los resultados opuestos que se han encontrado en otros estudios (259).

La Fetuina-A, relacionada con la homeostasis del hueso, también tiene un papel importante en el metabolismo energético. Se trata de una proteína secretada principalmente por hepatocitos, pero también por adipocitos. Su expresión está relacionada con la acumulación de grasa en adipocitos, lo que concuerda con los menores niveles que encontramos en el plasma de ratas con lactancia prolongada. Su incremento se asocia a mayores niveles de inflamación, un incremento en la captación de ácidos grasos por los adipocitos (260), la inhibición de la señalización de la insulina (261), la resistencia a la insulina (262), y la esteatosis hepática. De hecho, se considera un potencial biomarcador para la progresión del MASLD (263). Más investigaciones sobre esta proteína en el modelo de lactancia prolongada podrían aclarar si su disminución es simplemente consecuencia de la disminución de la masa grasa o si además la Fetuina-A está mediando en la mejora del fenotipo metabólico.

Por último, es interesante nombrar el gen *Cfd* o Factor D del complemento que, aunque está asociado a funciones enriquecidas de desarrollo de diversos órganos y sistema inmune en nuestro modelo, también se le atribuye un papel importante en el balance energético. Se produce de forma predominante en el tejido adiposo y es importante en la lipólisis, síntesis de triglicéridos, captación de glucosa, diferenciación de adipocitos y acumulación lipídica (264).

También se ha descrito como una adipoquina promotora de la secreción de insulina cuando los niveles de glucosa son elevados (265) y se la ha asociado a la protección contra la diabetes tipo dos en humanos (266). El estudio de CFD en nuestro modelo podría explicar si su disminución en plasma por la lactancia prolongada es el resultado de una disminución de la obesidad o ejerce algún efecto metabólico en estos animales.

Tomando todos nuestros resultados en conjunto, en la presente tesis identificamos y describimos numerosos factores hepáticos y plasmáticos que se encuentran modificados por la lactancia materna en ratas con obesidad inducida por dieta, y comenzamos estudios pormenorizados en dos de ellos, KLF15 y ANGPTL4. Hemos estudiado su presencia en diferentes tejidos y leches maternas, descrito su modulación por lactancia y dieta en hígado y plasma a diferentes edades, y descrito por vez primera la elevación de los niveles de ANGPTL4 en el LHA que provoca el FGF21 hepático. Esta información permite la apertura de nuevas líneas de investigación para aclarar la función de estos factores en el modelo, y su potencial terapéutico contra la obesidad.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos tras la realización de esta tesis nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El modelo de lactancia prolongada es reproducible. La lactancia prolongada protege contra el desarrollo de obesidad inducida por dieta disminuyendo el peso corporal y mejorando el perfil lipídico.
2. La lactancia prolongada en ratas con obesidad inducida por dieta modifica la expresión de 199 genes en hígado, con funciones enriquecidas en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Se han identificado genes como *Onecut1*, *Pepck*, *Socs2*, *Hsd17b2* y *Nr1d1* que podrían estar mediando en la mejora del perfil glucémico y la protección contra la enfermedad hepática que promueve la lactancia prolongada.
3. La expresión de ANGPTL4 y KLF15 en hígado está modificada por la lactancia prolongada y su concentración en leche materna se incrementa con las semanas de lactancia.
4. El incremento de FGF21 en cerebro proveniente del hígado en los animales con lactancia prolongada, ejerce un efecto estimulador de los niveles de ANGPTL4 en el hipotálamo lateral.
5. En el hipotálamo lateral, los niveles de ANGPTL4 y LPL se modifican de manera opuesta en respuesta a la lactancia prolongada y a la inhibición hepática de FGF21.
6. La modulación de los niveles de KLF15 por la lactancia prolongada es dependiente del tiempo de exposición a la dieta alta en grasa, y distinta a la modulación de su expresión.
7. La lactancia prolongada en ratas con obesidad inducida por dieta modifica los niveles de 152 proteínas plasmáticas, alterando funciones relacionadas con la hemostasis, inmunidad, el metabolismo óseo o el desarrollo cerebral. Proteínas como ENO3, Fetuina-A y CFD, asociadas al metabolismo energético, se plantean como potenciales mediadores del efecto protector de la lactancia prolongada contra la obesidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haslam D. Obesity: a medical history. *Obesity Reviews*. 2007 Mar 19;8(s1):31–6.
2. Conard NJ. A female figurine from the basal Aurignacian of Hohle Fels Cave in southwestern Germany. *Nature*. 2009 May;459(7244):248–52.
3. Sumińska M, Podgórski R, Bogusz-Górna K, Skowrońska B, Mazur A, Fichna M. Historical and cultural aspects of obesity: From a symbol of wealth and prosperity to the epidemic of the 21st century. *Obesity Reviews*. 2022 Jun 2;23(6).
4. Eknayan G. A History of Obesity, or How What Was Good Became Ugly and Then Bad. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2006 Oct;13(4):421–7.
5. Bray GA. Lavoisier and Scientific Revolution: The Oxygen Theory Displaces Air, Fire, Earth, and Water. *Obes Res*. 1994 Mar 6;2(2):183–8.
6. World Health Organization. World Health Assembly, 1. (1948). WHO regulations no. 1 regarding nomenclature (including the compilation and publication of statistics) with respect to disease and causes of death. [Internet]. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/97656>
7. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. 2024 [cited 2024 Aug 19]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
8. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* [Internet]. 2020 Oct;396(10258):1223–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620307522>
9. Loos RJF, Yeo GSH. The genetics of obesity: from discovery to biology. *Nat Rev Genet*. 2022 Feb 1;23(2):120–33.
10. World Health Organization. Regional Office for Europe. WHO European Regional Obesity : Report 2022.
11. Phelps NH, Singleton RK, Zhou B, Heap RA, Mishra A, Bennett JE, et al. Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*. 2024 Mar 16;403(10431):1027–50.
12. Okunogbe A, Nugent R, Spencer G, Powis J, Ralston J, Wilding J. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. *BMJ Glob Health*. 2022 Sep 20;7(9).
13. World Health Organization. Seventy-fifth World Health Assembly Geneva, 22-28 may 2022. Resolutions and decisions annexes.
14. World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2023 [Internet]. 2023 [cited 2024 Aug 8]. Available from: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2023>
15. Kelly AS. Current and future pharmacotherapies for obesity in children and adolescents. *Nat Rev Endocrinol*. 2023 Sep 1;19(9):534–41.
16. Rajamoorthi A, LeDuc CA, Thaker V V. The metabolic conditioning of obesity: A review of the pathogenesis of obesity and the epigenetic pathways that “program” obesity from conception. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Oct 18;13.
17. Lukaszewski MA, Eberlé D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013 Nov 15;305(10):E1195–207.
18. Ann M. Ingalls, Margaret M. Dickie, G. D. Snell. Obese, a new mutation in the house mouse. *Journal of Heredity*. 1950;41(12):317–8.

19. Keller M, Svensson SIA, Rohde-Zimmermann K, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and Epigenetics in Obesity: What Do We Know so Far? *Curr Obes Rep*. 2023 Dec 1;12(4):482–501.
20. Tirthani E, S. Said M, Rehman A. Genetics and Obesity. [Internet]. 2024th ed. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023 [cited 2024 Jul 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573068/>
21. Masood B, Moorthy M. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*. 2023 Jul 1;23(4):284–91.
22. Yeo GSH, Chao DHM, Siegert AM, Koerperich ZM, Ericson MD, Simonds SE, et al. The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy. Vol. 48, *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH; 2021.
23. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):197–206.
24. Perdomo CM, Cohen R V., Sumithran P, Clément K, Frühbeck G. Contemporary medical, device, and surgical therapies for obesity in adults. *The Lancet*. 2023 Apr 1;401(10382):1116–30.
25. Clavería Fontán A, Puñal Riobóo J. Cirugía bariátrica en diabetes mellitus tipo 2 con IMC ≤ 30 kg/m² . Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. . 2009.
26. Affinati AH, Esfandiari NH, Oral EA, Kraftson AT. Bariatric Surgery in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019 Dec 4;19(12):156.
27. Fouse T, Brethauer S. Resolution of Comorbidities and Impact on Longevity Following Bariatric and Metabolic Surgery. *Surgical Clinics of North America*. 2016 Aug;96(4):717–32.
28. Chakhtoura M, Haber R, Ghezzawi M, Rhayem C, Tcheroyan R, Mantzoros CS. Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. *EClinicalMedicine*. 2023 Apr 1;58.
29. Henderson Lewis K, Sloan CE, Bessesen DH, Arterburn D. Effectiveness and safety of drugs for obesity. *BMJ*. BMJ Publishing Group; 2024.
30. European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Aug 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/search?search_api_fulltext=obesity&sort_bef_combine=field_ema_computed_date_field_ASC&f%5B0%5D=ema_search_categories%3A83&page=1
31. Gutgesell RM, Nogueiras R, Tschöp MH, Müller TD. Dual and Triple Incretin-Based Co-agonists: Novel Therapeutics for Obesity and Diabetes. *Diabetes Therapy*. 2024 May 1;15(5):1069–84.
32. J Bailey C. Tirzepatide: a new low for bodyweight and blood glucose. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021 Oct 9;10(10):646–8.
33. Müller TD, Blüher M, Tschöp MH, DiMarchi RD. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Mar 1;21(3):201–23.
34. Jebeile H, Kelly AS, O'Malley G, Baur LA. Obesity in children and adolescents: epidemiology, causes, assessment, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022 May 1;10(5):351–65.
35. Chapelot D, Charlot K. Physiology of energy homeostasis: Models, actors, challenges and the glucostatic loop. *Metabolism*. 2019 Mar 1;92:11–25.
36. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab*. 2014 May 6;19(5):741–56.

37. Myers MG, Refined AH, Richardson N, Schwartz MW. Central nervous system regulation of organismal energy and glucose homeostasis. *Nat Metab.* 2021 Jun 1;3(6):737–50.
38. Per Brodal. The central nervous system. Structure and Function (Fourth Edition). Oxford University Press Inc, editor. 2010.
39. Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *DMM Disease Models and Mechanisms.* 2017 Jun 1;10(6):679–89.
40. Brüning JC, Fenselau H. Integrative neurocircuits that control metabolism and food intake. *Science* (1979). 2023 Sep 29;381(6665).
41. Pena-Leon V, Folgueira C, Barja-Fernández S, Pérez-Lois R, Da Silva Lima N, Martin M, et al. Prolonged breastfeeding protects from obesity by hypothalamic action of hepatic FGF21. *Nat Metab.* 2022 Jul 1;4(7):901–17.
42. Stuber GD, Wise RA. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci.* 2016 Jan 27;19(2):198–205.
43. Rossi MA. Control of energy homeostasis by the lateral hypothalamic area. *Trends Neurosci.* 2023 Sep 1;46(9):738–49.
44. Al-Massadi O, Dieguez C, Schneeberger M, López M, Schwaninger M, Prevot V, et al. Multifaceted actions of melanin-concentrating hormone on mammalian energy homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 2021 Dec;17(12):745–55.
45. Könnér AC, Brüning JC. Selective Insulin and Leptin Resistance in Metabolic Disorders. *Cell Metab.* 2012 Aug;16(2):144–52.
46. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell.* 2015 Oct;163(3):560–9.
47. Pena-Leon V, Perez-Lois R, Villalon M, Prida E, Muñoz-Moreno D, Fernø J, et al. Novel mechanisms involved in leptin sensitization in obesity. *Biochem Pharmacol.* 2024 May;223:116129.
48. Novikoff A, Müller TD. The molecular pharmacology of glucagon agonists in diabetes and obesity. *Peptides* (NY). 2023 Jul;165:171003.
49. Al-Massadi O, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R, Quiñones M. Glucagon Control on Food Intake and Energy Balance. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 11;20(16).
50. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 2000 Jun;1492(1):203–6.
51. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature.* 2014 Nov 20;515(7527):355–64.
52. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2014 Feb;13(2):397–406.
53. Szczepańska E, Gietka-Czernel M. FGF21: A Novel Regulator of Glucose and Lipid Metabolism and Whole-Body Energy Balance. *Hormone and Metabolic Research.* 2022 Apr 1;54(4):203–11.
54. Giralt M, Gavaldà-Navarro A, Villarroya F. Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Dec 15;418:66–73.

55. Owen BM, Ding X, Morgan DA, Coate KC, Bookout AL, Rahmouni K, et al. FGF21 Acts Centrally to Induce Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure, and Weight Loss. *Cell Metab.* 2014 Oct;20(4):670–7.
56. Douris N, Stevanovic DM, Fisher ffolliott M, Cisu TI, Chee MJ, Nguyen NL, et al. Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in Male Mice. *Endocrinology.* 2015 Jul 1;156(7):2470–81.
57. Talukdar S, Owen BM, Song P, Hernandez G, Zhang Y, Zhou Y, et al. FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab.* 2016 Feb;23(2):344–9.
58. Geng L, Lam KSL, Xu A. The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. Vol. 16, *Nature Reviews Endocrinology.* Nature Research; 2020. p. 654–67.
59. Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2016 Feb 23;59:1098–103.
60. Holst JJ, Holland W, Gromada J, Lee Y, Unger RH, Yan H, et al. Insulin and Glucagon: Partners for Life. *Endocrinology.* 2017 Apr 1;158(4):696–701.
61. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177–97.
62. Zhang R, Zhang K. A unified model for regulating lipoprotein lipase activity. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2024 Jun;35(6):490–504.
63. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP–responsive element–binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med.* 2011 Jul 12;17(7):812–5.
64. Fernández-Hernando C, Suárez Y. ANGPTL4: A multifunctional protein involved in metabolism and vascular homeostasis. *Curr Opin Hematol.* 2020 May 1;27(3):206–13.
65. Kim I, Kim HG, Kim H, Kim HH, Kwang PARK S, Uhm CS, et al. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *Biochem J.* 2000 Mar 15;346(Pt3):603–10.
66. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Sep 15;275(37):28488–93.
67. Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Target Gene Encoding a Novel Angiopoietin-Related Protein Associated with Adipose Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(14):5343–9.
68. Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, et al. The Direct Peroxisome Proliferator-activated Receptor Target Fasting-induced Adipose Factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) Is Present in Blood Plasma as a Truncated Protein That Is Increased by Fenofibrate Treatment. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Aug;279(33):34411–20.
69. Chomel C, Cazes A, Faye C, Bignon M, Gomez E, Ardidie-Robouant C, et al. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *The FASEB Journal.* 2009 Mar 19;23(3):940–9.
70. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue [Internet]. 2006. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604026103
71. Ge H, Yang G, Yu X, Pourbahrami T, Li C. Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiopoietin-like protein 4. *J Lipid Res.* 2004 Nov;45(11):2071–9.

72. Ge H, Yang G, Huang L, Motola DL, Pourbahrami T, Li C. Oligomerization and Regulated Proteolytic Processing of Angiopoietin-like Protein 4. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jan;279(3):2038–45.
73. Yin W, Romeo S, Chang S, Grishin N V., Hobbs HH, Cohen JC. Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 May 8;284(19):13213–22.
74. Aryal B, Price NL, Suarez Y, Fernández-Hernando C. ANGPTL4 in Metabolic and Cardiovascular Disease. *Trends Mol Med*. 2019 Aug 1;25(8):723–34.
75. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2009;297:271–88. Available from: <http://www.ajpendo.org>
76. Sylvers-Davie KL, Davies BSJ. Regulation of lipoprotein metabolism by ANGPTL3, ANGPTL4, and ANGPTL8. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021 Oct 1;321(4):E493–508.
77. Cushing EM, Chi X, Sylvers KL, Shetty SK, Potthoff MJ, Davies BSJ. Angiopoietin-like 4 directs uptake of dietary fat away from adipose during fasting. *Mol Metab*. 2017 Aug;6(8):809–18.
78. Spitler KM, Shetty SK, Cushing EM, Sylvers-Davie KL, Davies BSJ. Regulation of plasma triglyceride partitioning by adipose-derived ANGPTL4 in mice. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
79. Ploug M. ANGPTL4: A new mode in the regulation of intravascular lipolysis. *Curr Opin Lipidol*. 2022 Apr 1;33(2):112–9.
80. Lee EC, Desai U, Gololobov G, Hong S, Feng X, Yu XC, et al. Identification of a New Functional Domain in Angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) Involved in Binding and Inhibition of Lipoprotein Lipase (LPL). *Journal of Biological Chemistry*. 2009 May;284(20):13735–45.
81. Lichtenstein L, Mattijssen F, de Wit NJ, Georgiadi A, Hooiveld GJ, van der Meer R, et al. Angptl4 Protects against Severe Proinflammatory Effects of Saturated Fat by Inhibiting Fatty Acid Uptake into Mesenteric Lymph Node Macrophages. *Cell Metab*. 2010 Dec;12(6):580–92.
82. Köster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, et al. Transgenic Angiopoietin-Like (Angptl)4 Overexpression and Targeted Disruption of Angptl4 and Angptl3: Regulation of Triglyceride Metabolism. *Endocrinology*. 2005 Nov 1;146(11):4943–50.
83. Desai U, Lee EC, Chung K, Gao C, Gay J, Key B, et al. Lipid-lowering effects of anti-angiopoietin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiopoietin-like 4 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Jul 10;104(28):11766–71.
84. Dewey FE, Gusarova V, O'Dushlaine C, Gottesman O, Trejos J, Hunt C, et al. Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*. 2016 Mar 24;374(12):1123–33.
85. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 Dec 15;
86. Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Müller M, et al. The Fasting-induced Adipose Factor/Angiopoietin-like Protein 4 Is Physically Associated with Lipoproteins and Governs Plasma Lipid Levels and Adiposity. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Jan;281(2):934–44.

87. Janssen AWF, Katiraei S, Bartosinska B, Eberhard D, Willems van Dijk K, Kersten S. Loss of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in mice with diet-induced obesity uncouples visceral obesity from glucose intolerance partly via the gut microbiota. *Diabetologia*. 2018 Jun 3;61(6):1447–58.
88. Spitler KM, Shetty SK, Cushing EM, Sylvers-Davie KL, Davies BSJ. Chronic high-fat feeding and prolonged fasting in liver-specific ANGPTL4 knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021 Oct 1;321(4):E464–78.
89. Barja-Fernandez S, Moreno-Navarrete JM, Folgueira C, Xifra G, Sabater M, Castelao C, et al. Plasma ANGPTL-4 is Associated with Obesity and Glucose Tolerance: Cross-Sectional and Longitudinal Findings. *Mol Nutr Food Res*. 2018 May 30;62(10).
90. Cinkajzlová A, Mráz M, Lacinová Z, Kloučková J, Kaválková P, Kratochvílová H, et al. Angiopoietin-like protein 3 and 4 in obesity, type 2 diabetes mellitus, and malnutrition: the effect of weight reduction and realimentation. *Nutr Diabetes*. 2018 Apr 25;8(1):21.
91. Mehta N, Qamar A, Qu L, Qasim AN, Mehta NN, Reilly MP, et al. Differential Association of Plasma Angiopoietin-Like Proteins 3 and 4 With Lipid and Metabolic Traits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 May;34(5):1057–63.
92. Aryal B, Singh AK, Zhang X, Varela L, Rotllan N, Goedeke L, et al. Absence of ANGPTL4 in adipose tissue improves glucose tolerance and attenuates atherogenesis. *JCI Insight*. 2018 Mar 22;3(6).
93. Singh AK, Chaube B, Zhang X, Sun J, Citrin KM, Canfrán-Duque A, et al. Hepatocyte-specific suppression of ANGPTL4 improves obesity-associated diabetes and mitigates atherosclerosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2021 Sep 1;131(17).
94. Deng M, Kersten S. Characterization of sexual dimorphism in ANGPTL4 levels and function. *J Lipid Res*. 2024 Apr;65(4):100526.
95. Gusarova V, O'Dushlaine C, Teslovich TM, Benotti PN, Mirshahi T, Gottesman O, et al. Genetic inactivation of ANGPTL4 improves glucose homeostasis and is associated with reduced risk of diabetes. *Nat Commun*. 2018 Jun 13;9(1):2252.
96. McCulloch LJ, Bramwell LR, Knight B, Kos K. Circulating and tissue specific transcription of angiopoietin-like protein 4 in human Type 2 diabetes. *Metabolism*. 2020 May 1;106.
97. Wang Y, Liu LM, Wei L, Ye WW, Meng XY, Chen F, et al. Angiopoietin-like protein 4 improves glucose tolerance and insulin resistance but induces liver steatosis in high-fat-diet mice. *Mol Med Rep*. 2016 Oct 1;14(4):3293–300.
98. Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RLC, et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Apr 26;102(17):6086–91.
99. Yu Y, Fuscoe JC, Zhao C, Guo C, Jia M, Qing T, et al. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nat Commun*. 2014 Feb 10;5(1):3230.
100. Varela L, Kim JG, Fernández-Tussy P, Aryal B, Liu ZW, Fernández-Hernando C, et al. Astrocytic lipid metabolism determines susceptibility to diet-induced obesity. *Sci Adv* [Internet]. 2021 Dec 10;7(50):2814. Available from: <https://www.science.org>
101. Kim HK, Youn BS, Shin MS, Namkoong C, Park KH, Baik JH, et al. Hypothalamic Angptl4/Fiaf is a novel regulator of food intake and body weight. *Diabetes*. 2010 Nov;59(11):2772–80.

102. Vienberg SG, Kleinridders A, Suzuki R, Kahn CR. Differential effects of angiopoietin-like 4 in brain and muscle on regulation of lipoprotein lipase activity. *Mol Metab*. 2015 Feb 1;4(2):144–50.
103. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase in the brain and nervous system. Vol. 32, *Annual Review of Nutrition*. 2012. p. 147–60.
104. Rhea EM, Banks WA. Interactions of Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins with the Blood-Brain Barrier. *Pharm Res*. 2021 Sep 13;38(9):1469–75.
105. Wang H, Astarita G, Taussig MD, Bharadwaj KG, Dipatrizio N V., Nave KA, et al. Deficiency of lipoprotein lipase in neurons modifies the regulation of energy balance and leads to obesity. *Cell Metab*. 2011 Jan 5;13(1):105–13.
106. Chen H, Li LL, Du Y. Krüppel-like factor 15 in liver diseases: Insights into metabolic reprogramming. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 2;14:1115226.
107. Uchida S, Tanaka Y, Ito H, Saitoh-Ohara F, Inazawa J, Yokoyama KK, et al. Transcriptional Regulation of the CLC-K1 Promoter by myc-Associated Zinc Finger Protein and Kidney-Enriched Krüppel-Like Factor, a Novel Zinc Finger Repressor. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct 15;20(19):7319–31.
108. Teshigawara K, Ogawa W, Mori T, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, et al. Role of Krüppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Feb 18;327(3):920–6.
109. Takeuchi Y, Murayama Y, Aita Y, Mehrazad Saber Z, Karkoutly S, Tao D, et al. GR-KLF15 pathway controls hepatic lipogenesis during fasting. *FEBS Journal*. 2024 Jan 1;291(2):259–71.
110. Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Piao X, et al. KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. *Cell Rep*. 2016 Aug 30;16(9):2373–86.
111. Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Mehrazad-Saber Z, Ho MH, Huyen Y, et al. FoxO-KLF15 pathway switches the flow of macronutrients under the control of insulin. *iScience*. 2021 Dec 17;24(12).
112. Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, et al. Regulation of Gluconeogenesis by Krüppel-like Factor 15. *Cell Metab*. 2007 Apr 4;5(4):305–12.
113. Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, et al. Role of KLF 15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes*. 2010 Jul;59(7):1608–15.
114. Jeyaraj D, Scheer FAJL, Ripperger JA, Haldar SM, Lu Y, Prosdocimo DA, et al. Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis. *Cell Metab*. 2012 Mar 7;15(3):311–23.
115. Jung DY, Chalasani UD, Pan N, Friedline RH, Prosdocimo DA, Nam M, et al. KLF15 Is a Molecular Link between Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance. *PLoS One*. 2013 Oct 22;8(10).
116. Zhou L, Li Q, Chen A, Liu N, Chen N, Chen X, et al. KLF15-activating Twist2 ameliorated hepatic steatosis by inhibiting inflammation and improving mitochondrial dysfunction via NF- κ B-FGF21 or SREBP1c-FGF21 pathway. *FASEB Journal*. 2019 Dec 1;33(12):14254–69.
117. Matoba K, Lu Y, Zhang R, Chen ER, Sangwung P, Wang B, et al. Adipose KLF15 Controls Lipid Handling to Adapt to Nutrient Availability. *Cell Rep*. 2017 Dec 12;21(11):3129–40.
118. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, et al. Role of Krüppel-like Factor 15 (KLF15) in Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Apr;280(13):12867–75.

119. Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Sen S, et al. The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Sep 13;277(37):34322–8.
120. Pettersson M, Viljakainen H, Loid P, Mustila T, Pekkinen M, Armenio M, et al. Copy Number Variants Are Enriched in Individuals With Early-Onset Obesity and Highlight Novel Pathogenic Pathways. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Aug 1;102(8):3029–39.
121. Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, Cao Y, Inagaki K, Sakai M, et al. Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Oct 28;286(43):37458–69.
122. Haldar SM, Jeyaraj D, Anand P, Zhu H, Lu Y, Prosdocimo DA, et al. Kruppel-like factor 15 regulates skeletal muscle lipid flux and exercise adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Apr 24;109(17):6739–44.
123. Prosdocimo DA, Anand P, Liao X, Zhu H, Shelkay S, Artero-Calderon P, et al. Kruppel-like Factor 15 Is a Critical Regulator of Cardiac Lipid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Feb;289(9):5914–24.
124. Malonia SK, Sinha S, Lakshminarasimhan P, Singh K, Jalota-Badhwar A, Rampalli S, et al. Gene regulation by SMAR1: Role in cellular homeostasis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2011 Jan;1815(1):1–12.
125. Sinha S, Malonia SK, Mittal SPK, Mathai J, Pal JK, Chattopadhyay S. Chromatin remodelling protein SMAR1 inhibits p53 dependent transactivation by regulating acetyl transferase p300. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Jan;44(1):46–52.
126. Pavithra L, Mukherjee S, Sreenath K, Kar S, Sakaguchi K, Roy S, et al. SMAR1 Forms a Ternary Complex with p53-MDM2 and Negatively Regulates p53-mediated Transcription. *J Mol Biol*. 2009 May;388(4):691–702.
127. Liu Y, Su Z, Tavana O, Gu W. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression. *Cancer Cell*. 2024 Jun;42(6):946–67.
128. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol Cell*. 2005 Apr;18(3):283–93.
129. Krstic J, Reinisch I, Schupp M, Schulz TJ, Prokesch A. p53 Functions in Adipose Tissue Metabolism and Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 4;19(9):2622.
130. Gonzalez-Rellán MJ, Fondevila MF, Fernandez U, Rodríguez A, Varela-Rey M, Veyrat-Durebex C, et al. O-GlcNAcylated p53 in the liver modulates hepatic glucose production. *Nat Commun*. 2021 Aug 20;12(1):5068.
131. Quiñones M, Al-Massadi O, Folgueira C, Bremser S, Gallego R, Torres-Leal L, et al. p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1. *Nat Commun*. 2018 Aug 24;9(1):3432.
132. Krstic J, Galhuber M, Schulz TJ, Schupp M, Prokesch A. p53 as a Dichotomous Regulator of Liver Disease: The Dose Makes the Medicine. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 20;19(3):921.
133. Porteiro B, Fondevila MF, Buque X, Gonzalez-Rellán MJ, Fernandez U, Mora A, et al. Pharmacological stimulation of p53 with low-dose doxorubicin ameliorates diet-induced nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Mol Metab*. 2018 Feb;8:132–43.
134. Khan D, Katoch A, Das A, Sharathchandra A, Lal R, Roy P, et al. Reversible induction of translational isoforms of p53 in glucose deprivation. *Cell Death Differ*. 2015 Jul 9;22(7):1203–18.

135. Pant R, Alam A, Choksi A, Shah VK, Fimal P, Chattopadhyay S. Chromatin remodeling protein SMAR1 regulates adipogenesis by modulating the expression of PPAR γ . *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021 Dec 1;1866(12).
136. Tran LT, Park S, Kim SK, Lee JS, Kim KW, Kwon O. Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Exp Mol Med*. 2022 Apr 1;54(4):358–69.
137. Hachemi I, U-Din M. Brown Adipose Tissue: Activation and Metabolism in Humans. *Endocrinology and Metabolism*. 2023 Apr 1;38(2):214–22.
138. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Elia EF, Kessler SH, Kahn PA, et al. Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metab*. 2015 Jan;21(1):33–8.
139. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell*. 2012 Oct;151(2):400–13.
140. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):277–359.
141. Carpentier AC, Blondin DP, Haman F, Richard D. Brown Adipose Tissue—A Translational Perspective. *Endocr Rev*. 2023 Apr 1;44(2):143–92.
142. Heldmaier G, Buchberger A. Sources of heat during nonshivering thermogenesis in Djungarian hamsters: a dominant role of brown adipose tissue during cold adaptation. *Journal of Comparative Physiology B*. 1985;156(2):237–45.
143. Foster DO, Frydman ML. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol*. 1979 Mar 1;57(3):257–70.
144. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes*. 2009 Jul 1;58(7):1526–31.
145. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine*. 2009 Apr 9;360(15):1500–8.
146. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*. 2009 Apr 9;360(15):1509–17.
147. Symonds ME, Henderson K, Elvidge L, Bosman C, Sharkey D, Perkins AC, et al. Thermal Imaging to Assess Age-Related Changes of Skin Temperature within the Supraclavicular Region Co-Locating with Brown Adipose Tissue in Healthy Children. *J Pediatr*. 2012 Nov;161(5):892–8.
148. Betz MJ, Enerbäck S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):77–87.
149. Irshad Z, Dimitri F, Christian M, Zammit VA. Diacylglycerol acyltransferase 2 links glucose utilization to fatty acid oxidation in the brown adipocytes. *J Lipid Res*. 2017 Jan;58(1):15–30.
150. Becker AS, Nagel HW, Wolfrum C, Burger IA. Anatomical Grading for Metabolic Activity of Brown Adipose Tissue. *PLoS One*. 2016 Feb 22;11(2):e0149458.
151. Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhal-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, et al. Outdoor Temperature, Age, Sex, Body Mass Index, and Diabetic Status Determine the Prevalence, Mass, and Glucose-Uptake Activity of 18F-FDG-Detected BAT in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jan 1;96(1):192–9.

152. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013 Jun 28;15(6):659–67.
153. Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res.* 2007 Jan;48(1):41–51.
154. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009 Feb;9(2):203–9.
155. Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma K -I., Saito M, Suzuki-Miura T, et al. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell.* 2005 Jun 9;4(3):147–55.
156. Liu X, Rossmeisl M, McClaine J, Kozak LP. Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2003 Feb 1;111(3):399–407.
157. Olsen JM, Csikasz RI, Dehvari N, Lu L, Sandström A, Öberg AI, et al. β 3 - Adrenergically induced glucose uptake in brown adipose tissue is independent of UCP1 presence or activity: Mediation through the mTOR pathway. *Mol Metab.* 2017 Jun;6(6):611–9.
158. U Din M, Saari T, Raiko J, Kudomi N, Maurer SF, Lahesmaa M, et al. Postprandial Oxidative Metabolism of Human Brown Fat Indicates Thermogenesis. *Cell Metab.* 2018 Aug;28(2):207-216.e3.
159. Muzik O, Mangner TJ, Granneman JG. Assessment of Oxidative Metabolism in Brown Fat Using PET Imaging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3.
160. Saito M, Minokoshi Y, Shimazu T. Ventromedial hypothalamic stimulation accelerates norepinephrine turnover in brown adipose tissue of rats. *Life Sci.* 1987 Jul;41(2):193–7.
161. Song CK, Vaughan CH, Keen-Rhinehart E, Harris RBS, Richard D, Bartness TJ. Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2008 Aug;295(2):R417–28.
162. Folgueira C, Beiroa D, Porteiro B, Duquenne M, Puighermanal E, Fondevila MF, et al. Hypothalamic dopamine signalling regulates brown fat thermogenesis. *Nat Metab.* 2019 Aug 1;1(8):811–29.
163. World Health Organization. Breastfeeding [Internet]. [cited 2024 Aug 19]. Available from: https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1
164. Global breastfeeding collective, UNICEF, World Health Organization. Global breastfeeding scorecard 2023. Rates of breastfeeding increase around the world through improved protection and support [Internet]. 2023 Dec [cited 2024 Aug 19]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/375796/WHO-HEP-NFS-23.17-eng.pdf?sequence=1>
165. UNICEF. Breastfeeding [Internet]. 2018 May [cited 2024 Aug 19]. Available from: <https://www.unicef.org/lac/media/1886/file/PDF%20Lactancia%20materna.pdf>
166. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet.* 2016 Jan 30;387(10017):475–90.
167. Liang G, Zhao C, Zhang H, Mattei L, Sherrill-Mix S, Bittinger K, et al. The stepwise assembly of the neonatal virome is modulated by breastfeeding. *Nature.* 2020 May 28;581(7809):470–4.

168. Garofalo R. Cytokines in Human Milk. *J Pediatr*. 2010 Feb;156(2):S36–40.
169. Bardanzellu F, Fanos V, Reali A. “Omics” in Human Colostrum and Mature Milk: Looking to Old Data with New Eyes. *Nutrients*. 2017 Aug 7;9(8):843.
170. Yang M, Song D, Cao X, Wu R, Liu B, Ye W, et al. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Food Research International*. 2017 Feb;92:17–25.
171. de la Garza Puentes A, Martí Alemany A, Chisaguano AM, Montes Goyanes R, Castellote AI, Torres-Espínola FJ, et al. The Effect of Maternal Obesity on Breast Milk Fatty Acids and Its Association with Infant Growth and Cognition—The PREOBE Follow-Up. *Nutrients*. 2019 Sep 9;11(9):2154.
172. Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*. 2020 Apr 9;12(4):1039.
173. Field CJ. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *J Nutr*. 2005 Jan;135(1):1–4.
174. Suwaydi MA, Gridneva Z, Perrella SL, Wlodek ME, Lai CT, Geddes DT. Human Milk Metabolic Hormones: Analytical Methods and Current Understanding. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 13;22(16):8708.
175. Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*. 2016 May 11;8(5).
176. Yi DY, Kim SY. Human breast milk composition and function in human health: From nutritional components to microbiome and MicroRNAs. *Nutrients*. 2021 Sep 1;13(9).
177. Lackey KA, Fehrenkamp BD, Pace RM, Williams JE, Meehan CL, Mcguire MA, et al. Annual Review of Nutrition Breastfeeding Beyond 12 Months: Is There Evidence for Health Impacts? 2024;48:8. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-043020->
178. Badillo-Suárez PA, Rodríguez-Cruz M, Nieves-Morales X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2017 Sep 1;22(3):171–91.
179. Savino F, Fissore MF, Grassino EC, Nanni GE, Oggero R, Silvestro L. Ghrelin, leptin and IGF-I levels in breast-fed and formula-fed infants in the first years of life. *Acta Paediatr*. 2005 May 2;94(5):531–7.
180. Savino F, Costamagna M, Prino A, Oggero R, Silvestro L. Leptin levels in breast-fed and formula-fed infants. *Acta Paediatr*. 2002 Sep 2;91(9):897–902.
181. Miralles O, Sánchez J, Palou A, Picó C. A Physiological Role of Breast Milk Leptin in Body Weight Control in Developing Infants. *Obesity*. 2006 Aug 6;14(8):1371–7.
182. Brunner S, Schmid D, Zang K, Much D, Knoefel B, Kratzsch J, et al. Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years. *Pediatr Obes*. 2015 Feb 14;10(1):67–73.
183. Chan D, Goruk S, Becker AB, Subbarao P, Mandhane PJ, Turvey SE, et al. Adiponectin, leptin and insulin in breast milk: associations with maternal characteristics and infant body composition in the first year of life. *Int J Obes*. 2018 Jan 14;42(1):36–43.
184. Fields DA, Schneider CR, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obesity*. 2016 Jun 6;24(6):1213–21.
185. Fields DA, Demerath EW. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF- α in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatr Obes*. 2012 Aug 10;7(4):304–12.

186. Czernin S, Moreno LA, Pietrobelli A. From conception to infancy — early risk factors for childhood obesity. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2019;15(August). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0219-1>
187. Iglesia Altaba I, Larqué E, Mesa MD, Blanco-Carnero JE, Gomez-Llorente C, Rodríguez-Martínez G, et al. Early Nutrition and Later Excess Adiposity during Childhood: A Narrative Review. *Horm Res Paediatr*. 2022 Jun 1;95(2):112–9.
188. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of Infant Feeding on the Risk of Obesity Across the Life Course: A Quantitative Review of Published Evidence. *Pediatrics*. 2005 May 1;115(5):1367–77.
189. McCrory C, Layte R. Breastfeeding and risk of overweight and obesity at nine-years of age. *Soc Sci Med*. 2012 Jul;75(2):323–30.
190. Bergmann KE, Bergmann RL, von Kries R, Böhm O, Richter R, Dudenhausen JW, et al. Early determinants of childhood overweight and adiposity in a birth cohort study: role of breast-feeding. *Int J Obes*. 2003 Feb 14;27(2):162–72.
191. Gibson LA, Hernández Alava M, Kelly MP, Campbell MJ. The effects of breastfeeding on childhood BMI: a propensity score matching approach. *J Public Health (Bangkok)*. 2016 Sep 9;
192. Beyerlein A, Toschke AM, von Kries R. Breastfeeding and Childhood Obesity: Shift of the Entire BMI Distribution or Only the Upper Parts? *Obesity*. 2008 Dec 6;16(12):2730–3.
193. Oddy WH, Sherriff JL, de Klerk NH, Kendall GE, Sly PD, Beilin LJ, et al. The Relation of Breastfeeding and Body Mass Index to Asthma and Atopy in Children: A Prospective Cohort Study to Age 6 Years. *Am J Public Health*. 2004 Sep;94(9):1531–7.
194. Dang J, Chen T, Ma N, Liu Y, Zhong P, Shi D, et al. Associations between Breastfeeding Duration and Obesity Phenotypes and the Offsetting Effect of a Healthy Lifestyle. *Nutrients*. 2022 May 10;14(10):1999.
195. Grummer-Strawn LM, Mei Z. Does Breastfeeding Protect Against Pediatric Overweight? Analysis of Longitudinal Data From the Centers for Disease Control and Prevention Pediatric Nutrition Surveillance System. *Pediatrics*. 2004 Feb 1;113(2):e81–6.
196. Qiao J, Dai LJ, Zhang Q, Ouyang YQ. A meta-analysis of the association between breastfeeding and early childhood obesity. *J Pediatr Nurs*. 2020 Jul 1;53:57–66.
197. van Dijk SJ, Tellam RL, Morrison JL, Muhlhausler BS, Molloy PL. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin Epigenetics*. 2015;7:66.
198. Cheshmeh S, Nachvak SM, Rezvani N, Saber A. Effects of Breastfeeding and Formula Feeding on the Expression Level of FTO, CPT1A and PPAR- α Genes in Healthy Infants. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Jun 26;13:2227–37.
199. Marousez L, Lesage J, Eberlé D. Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming? *Nutrients*. 2019 Dec 5;11(12):2966.
200. Palou M, Picó C, Palou A. Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. *Nutr Rev*. 2018 Oct 3;
201. Obermann-Borst SA, Eilers PHC, Tobi EW, de Jong FH, Slagboom PE, Heijmans BT, et al. Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res*. 2013 Sep 11;74(3):344–9.
202. Li Y, Gao D, Chen L, Ma T, Ma Y, Chen M, et al. The Association between Breastfeeding Duration and Lipid Profile among Children and Adolescents. *Nutrients*. 2021 Aug 8;13(8).

203. Hayosh O, Mandel D, Mimouni FB, Lahat S, Marom R, Lubetzky R. Prolonged duration of breastfeeding does not affect lipid profile in adulthood. *Breastfeed Med*. 2015 May;10(4):218–21.
204. Simmonds M, Llewellyn A, Owen CG, Woolacott N. Predicting adult obesity from childhood obesity: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2016;17(2):95–107.
205. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Cuppari C, Salpietro V, Filippelli M, et al. Obesity and breastfeeding: The strength of association. *Women and Birth* [Internet]. 2015;28(2):81–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wombi.2014.12.007>
206. Lemaigre FP, Durviaux SM, Truong O, Lannoy VJ, Hsuan JJ, Rousseau GG. Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Sep 3;93(18):9460–4.
207. V. L, J. D, C. P, F. L, G. R. Liver glucokinase gene expression is controlled by the onecut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia*. 2002 Aug 1;45(8):1136–41.
208. Russ-Silby J, Patel KA, Laver TW, Hawkes G, Johnson MB, Wakeling MN, et al. The Role of ONECUT1 Variants in Monogenic and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 2023 Nov 1;72(11):1729–34.
209. Heller S, Li Z, Lin Q, Geusz R, Breunig M, Hohwieler M, et al. Transcriptional changes and the role of ONECUT1 in hPSC pancreatic differentiation. *Commun Biol*. 2021 Nov 17;4(1):1298.
210. Pierreux CE, Stafford J, Demonte D, Scott DK, Vandenhoute J, O'Brien RM, et al. Antiglucocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):8961–6.
211. Leung KC, Doyle N, Ballesteros M, Sjogren K, Watts CKW, Low TH, et al. Estrogen inhibits GH signaling by suppressing GH-induced JAK2 phosphorylation, an effect mediated by SOCS-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Feb 4;100(3):1016–21.
212. Lindeman GJ, Wittlin S, Lada H, Naylor MJ, Santamaria M, Zhang JG, et al. SOCS1 deficiency results in accelerated mammary gland development and rescues lactation in prolactin receptor-deficient mice. *Genes Dev*. 2001 Jul 1;15(13):1631–6.
213. Yu Q, Zhang Y, Ni J, Shen Y, Hu W. Identification and analysis of significant genes in nonalcoholic steatohepatitis-hepatocellular carcinoma transformation: Bioinformatics analysis and machine learning approach. *Mol Immunol*. 2024 Oct;174:18–31.
214. Lu ML, Huang YW, Lin SX. Purification, Reconstitution, and Steady-state Kinetics of the Trans-membrane 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Jun;277(25):22123–30.
215. Meda C, Benedusi V, Cherubini A, Valenti L, Maggi A, Della Torre S. Hepatic estrogen receptor alpha drives masculinization in post-menopausal women with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *JHEP Rep*. 2024 Oct;6(10):101143.
216. Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szwegold NR, Reid RA, et al. Rev-erba, a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways. *Science* (1979). 2007 Dec 14;318(5857):1786–9.
217. Guo J, Miao G, Zhang W, Shi H, Lai P, Xu Y, et al. Depletion of ApoA5 aggravates spontaneous and diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by reducing hepatic NR1D1 in hamsters. *Theranostics*. 2024;14(5):2036–57.

218. Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Gréchez-Cassiau A, Klosen P, et al. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *The FASEB Journal*. 2012 Aug 4;26(8):3321–35.
219. Wong SD, Wright KP, Spencer RL, Vetter C, Hicks LM, Jenni OG, et al. Development of the circadian system in early life: maternal and environmental factors. *J Physiol Anthropol*. 2022 May 16;41(1):22.
220. Stoliar O. Secretory IgA against enterotoxins in breast-milk. *The Lancet*. 1976 Jun;307(7972):1258–61.
221. Warren RJ, Lepow ML, Bartsch GE, Robbins FC. The relationship of maternal antibody, breast feeding, and age to the susceptibility of newborn infants to infection with attenuated polioviruses. *Pediatrics*. 1964 Jul 1;34(1):4–13.
222. Boorman KE, Dodd BE, Gunther M. A Consideration of Colostrum and Milk as Sources of Antibodies which may be Transferred to the Newborn Baby. *Arch Dis Child*. 1958 Feb 1;33(167):24–9.
223. Nash G, Paidimuddala B, Zhang L. Structural aspects of the MHC expression control system. *Biophys Chem*. 2022 May;284:106781.
224. Everaert C, Luypaert M, Maag JL V., Cheng QX, Dinger ME, Hellemans J, et al. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci Rep*. 2017 May 8;7(1):1559.
225. Zhou B, Claflin KE, Flippo KH, Sullivan AI, Asghari A, Tadinada SM, et al. Central FGF21 production regulates memory but not peripheral metabolism. *Cell Rep*. 2022 Aug;40(8):111239.
226. Xu C, Messina A, Somm E, Miraoui H, Kinnunen T, Acierno J, et al. KLB, encoding β -Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med*. 2017 Oct 28;9(10):1379–97.
227. Hsuchou H, Pan W, Kastin AJ. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides (NY)*. 2007 Dec;28(12):2382–6.
228. Du X, Rosenfield RL, Qin K. KLF15 Is a Transcriptional Regulator of the Human 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 5 Gene. A Potential Link between Regulation of Testosterone Production and Fat Stores in Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jul 1;94(7):2594–601.
229. Yuce K, Ozkan AI. The kruppel-like factor (KLF) family, diseases, and physiological events. *Gene*. 2024 Feb;895:148027.
230. Kasper P, Vohlen C, Dinger K, Mohr J, Hucklenbruch-Rother E, Janoschek R, et al. Renal Metabolic Programming Is Linked to the Dynamic Regulation of a Leptin-Klf15 Axis and Akt/AMPK α Signaling in Male Offspring of Obese Dams. *Endocrinology*. 2017 Oct 1;158(10):3399–415.
231. Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Sep 13;91(19):9151–4.
232. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. Vol. 15, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.; 2004. p. 129–35.
233. Yu S, Meng S, Xiang M, Ma H. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cell metabolism: Roles and mechanisms beyond gluconeogenesis. Vol. 53, *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH; 2021.
234. Anfossi G, Russo I, Trovati M. Platelet dysfunction in central obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2009 Jul;19(6):440–9.

235. Kaye SM, Pietiläinen KH, Kotronen A, Joutsu-Korhonen L, Kaprio J, Yki-Järvinen H, et al. Obesity-related derangements of coagulation and fibrinolysis a study of obesity-discordant monozygotic twin pairs. *Obesity*. 2012 Jan;20(1):88–94.
236. Mertens I, Gaal LF Van. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obesity Reviews*. 2002 May 23;3(2):85–101.
237. Eliasson M, Evrin PE, Lundblad D. Fibrinogen and fibrinolytic variables in relation to anthropometry, lipids and blood pressure. The Northern Sweden Monica study. *J Clin Epidemiol*. 1994 May;47(5):513–24.
238. Cigolini M, Targher G, Andreis IAB, Tonoli M, Agostino G, De Sandre G. Visceral Fat Accumulation and Its Relation to Plasma Hemostatic Factors in Healthy Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Mar;16(3):368–74.
239. Balagopal P, De Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, et al. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: Mechanistic, research, and clinical considerations for youth: A scientific statement from the american heart association. *Circulation*. 2011 Jun 14;123(23):2749–69.
240. Dai M, Wang L, Yang J, Chen J, Dou X, Chen R, et al. LDHA as a regulator of T cell fate and its mechanisms in disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Feb;158:114164.
241. Loid P, Pekkinen M, Mustila T, Tossavainen P, Viljakainen H, Lindstrand A, et al. Targeted Exome Sequencing of Genes Involved in Rare CNVs in Early-Onset Severe Obesity. *Front Genet*. 2022 Mar 7;13.
242. Haber SN, Fudge JL. The Primate Substantia Nigra and VTA: Integrative Circuitry and Function. *Crit Rev Neurobiol*. 1997;11(4):323–42.
243. Bae YJ, Kim JM, Sohn CH, Choi JH, Choi BS, Song YS, et al. Imaging the Substantia Nigra in Parkinson Disease and Other Parkinsonian Syndromes. *Radiology*. 2021 Aug;300(2):260–78.
244. Li J, Chen L, Qin Q, Wang D, Zhao J, Gao H, et al. Upregulated hexokinase 2 expression induces the apoptosis of dopaminergic neurons by promoting lactate production in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2022 Feb;163:105605.
245. Chen S, Lu FF, Seeman P, Liu F. Quantitative Proteomic Analysis of Human Substantia Nigra in Alzheimer's Disease, Huntington's Disease and Multiple Sclerosis. *Neurochem Res*. 2012 Dec 28;37(12):2805–13.
246. Chartrain I, Magre S, Maingourd M, Jost A. Effect of serum on organogenesis of the rat testis in vitro. *In Vitro*. 1984 Dec;20(12):912–22.
247. Tsuruta JK, O'Brien DA, Griswold MD. Sertoli Cell and Germ Cell Cystatin C: Stage-Dependent Expression of Two Distinct Messenger Ribonucleic Acid Transcripts in Rat Testes1. *Biol Reprod*. 1993 Nov 1;49(5):1045–54.
248. Ghyselinck NB, Vernet N, Dennefeld C, Giese N, Nau H, Chambon P, et al. Retinoids and spermatogenesis: Lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. *Developmental Dynamics*. 2006 Jun;235(6):1608–22.
249. Yang M, Mailhot G, MacKay CA, Mason-Savas A, Aubin J, Odgren PR. Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1 γ) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2262–70.
250. Ishii K aki, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, et al. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat Med*. 2009 Mar 1;15(3):259–66.

251. Väänänen HK. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes I and II in human bone, cartilage and giant cell tumor. *Histochemistry*. 1984 Aug 15;81(5):485–7.
252. Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, Väänänen HK. Carbonic Anhydrase II Plays a Major Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Effecting the Steady State Intracellular pH and Ca²⁺. *Exp Cell Res*. 1998 Jul;242(1):128–37.
253. NAKAMURA O, KAZI JA, OHNISHI T, ARAKAKI N, SHAO Q, KAJIHARA T, et al. Effects of Rat Fetuin on Stimulation of Bone Resorption in the Presence of Parathyroid Hormone. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999 Jan 22;63(8):1383–91.
254. Hou J, He C, He W, Yang M, Luo X, Li C. Obesity and Bone Health: A Complex Link. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Dec 21;8.
255. Li J, Gao Y, Yu T, Lange JK, LeBoff MS, Gorska A, et al. Obesity and leptin influence vitamin D metabolism and action in human marrow stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020 Apr;198:105564.
256. Elam MB, Cowan GS, Rooney RJ, Hiler ML, Yellaturu CR, Deng X, et al. Hepatic Gene Expression in Morbidly Obese Women: Implications for Disease Susceptibility. *Obesity*. 2009 Aug 6;17(8):1563–73.
257. Wen W, Wu P, Zhang Y, Chen Z, Sun J, Chen H. Comprehensive Analysis of NAFLD and the Therapeutic Target Identified. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:704704.
258. Lu D, Xia Q, Yang Z, Gao S, Sun S, Luo X, et al. ENO3 promoted the progression of NASH by negatively regulating ferroptosis via elevation of GPX4 expression and lipid accumulation. *Ann Transl Med*. 2021 Apr;9(8):661.
259. Wang Y, Zhao X, Zhang L, Yang C, Zhang K, Gu Z, et al. MicroRNA-34a Mediates High-Fat-Induced Hepatic Insulin Resistance by Targeting ENO3. *Nutrients*. 2023 Oct 31;15(21).
260. Chekol Abebe E, Tilahun Muche Z, Behaile T/Mariam A, Mengie Ayele T, Mekonnen Agidew M, Teshome Azezew M, et al. The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: A review. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:945287.
261. Srinivas PR, Wagner AS, Reddy L V, Deutsch DD, Leon MA, Goustin AS, et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Molecular Endocrinology*. 1993 Nov;7(11):1445–55.
262. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Kröber SM, et al. α 2-Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. *Diabetes Care*. 2006 Apr 1;29(4):853–7.
263. Milani I, Codini M, Guarisco G, Chinucci M, Gaita C, Leonetti F, et al. Hepatokines and MASLD: The GLP1-Ras-FGF21-Fetuin-A Crosstalk as a Therapeutic Target. *Int J Mol Sci*. 2024 Oct 8;25(19):10795.
264. Song NJ, Kim S, Jang BH, Chang SH, Yun UJ, Park KM, et al. Small Molecule-Induced Complement Factor D (Adipsin) Promotes Lipid Accumulation and Adipocyte Differentiation. *PLoS One*. 2016 Sep 9;11(9):e0162228.
265. Lo JC, Ljubcic S, Leibiger B, Kern M, Leibiger IB, Moede T, et al. Adipsin Is an Adipokine that Improves β Cell Function in Diabetes. *Cell*. 2014 Jul;158(1):41–53.
266. Gómez-Banoy N, Guseh JS, Li G, Rubio-Navarro A, Chen T, Poirier B, et al. Adipsin preserves beta cells in diabetic mice and associates with protection from type 2 diabetes in humans. *Nat Med*. 2019 Nov 7;25(11):1739–47.

Índice de ilustraciones

Ilustración 1: Resumen de los mecanismos del balance energético.	19
Ilustración 2: Circuitos hipotalámicos reguladores del apetito y el gasto energético.....	20
Ilustración 3: Inhibición de LPL por ANGPTL4.....	24
Ilustración 4: Distribución de los ácidos grasos por ANGPTL4, ANGPTL3 y ANGPTL8.	25
Ilustración 5: Funciones de KLF15 tejido específicas en estado de ayuno y postprandial.	28
Ilustración 6: Resumen gráfico de la protección contra la obesidad por la lactancia prolongada (41).....	74

Índice de tablas

Tabla 1: Genes asociados a la obesidad monogénica	13
Tabla 2: Genes asociados a la obesidad poligénica	14
Tabla 3: Componentes de la anestesia ¹	39
Tabla 4: Composición de dietas.....	41
Tabla 5: Coordenadas esterotáxicas desde el bregma ¹	43
Tabla 6: Componentes del tampón de lisis	45
Tabla 7: Composición del tampón de carga 5x.....	46
Tabla 8: Composición de los geles separadores (10 mL)	47
Tabla 9: Composición del gel concentrador (3 mL)	47
Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis.....	48
Tabla 11: Tampón de transferencia.....	48
Tabla 12. Tampón de lavado (PBST)	48
Tabla 13: Referencias de anticuerpos	49
Tabla 14: Tampón de estriado ¹	49
Tabla 15: Cebadores utilizados en la PCR.....	53
Tabla 16: Componentes de la PCR	53
Tabla 17: Condiciones de PCR.....	53
Tabla 18: Kits comerciales para mediciones plasmáticas.....	54
Tabla 19: Composición del tampón de carga.....	55
Tabla 20: Composición del gel de acrilamida.....	55
Tabla 21. Referencias de reactivos y péptidos.....	58
Tabla 22. Referencias de material y equipos	59
Tabla 23: Programas informáticos	59
Tabla 24: Funciones enriquecidas significativamente entre los genes modificados del análisis RNA-seq.....	66
Tabla 25: Genes seleccionados para validación y las funciones a las que están asociados.	67
Tabla 26: Funciones enriquecidas significativamente entre las proteínas modificadas del análisis proteómico	86

ANEXO I



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE A CORUÑA
A CORUÑA

Data 14/05/2018 13:44:11

SAÍDA 52855 / RX 712271



José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/007

Data de inicio: 10.05.2018

Persoa interesada: Rubén Nogueiras Pozo

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou primeiramente o 28.12.2017 e despois completou o 17.04.2018, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Mecanismos centrais e periféricos no control da homeostase enerxética

Nome do centro usuario: CIMUS

Persoa responsable do proxecto: Rubén Nogueiras Pozo

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario da Facultade de Medicina do CIMUS

Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia (DOG 84, do 1 de maio de 2009) e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que se aproba a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural (DOG 220, do 18 de novembro de 2015).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O mencionado proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva aos tres anos.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos, transcorrido este tempo, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non lle pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle ao CIMUS da USC esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 10 de maio de 2018
O xefe territorial

Manuel Rodríguez Vázquez

Asinado por: RODRIGUEZ VAZQUEZ, MANUEL
Cargo: XEFE TERRITORIAL
Data e hora: 14/05/2018 08:46:39

CVE: hkBhBnYg1
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>



ANEXO II



Código de registro 2023/126

DICTAMEN DEL Comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo (CEI-SL)

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó la propuesta del estudio

Título: Biomarcadores de reprogramación metabólica asociados al efecto protector de la lactancia materna sobre la obesidad y patologías asociadas
Código del promotor: PI22/00202
Código de Registro: 2023/126
Promotor: Luisa María Seoane Camino
Versión y fecha: Versión 1; 10/01/2023

Que este Comité vista la solicitud, ha realizado la evaluación del estudio de investigación y ha valorado las respuestas del promotor a las aclaraciones solicitadas (si las hubiera), de acuerdo con lo previsto en el Decreto 63/2013 por el que se regulan los Comités de ética de la investigación en Galicia y considera que:

- 1 El procedimiento para obtener el consentimiento informado, si lo hubiera, (incluyendo las hojas de información y consentimientos informados mencionados en el encabezamiento), y el plan de reclutamiento de sujetos previsto son adecuados y cumplen con los requisitos para la obtención del consentimiento informado previstos en la legislación vigente.
- 2 El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.
- 3 El uso futuro de las muestras biológicas obtenidas durante el estudio, si las hubiera, se adecua a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.

Que este Comité decidió emitir **DICTAMEN FAVORABLE** en la reunión celebrada el día 22/03/2023. Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación para que la decisión del citado CEI sea válida.

Que el Comité tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del mismo es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés, se ausentará durante la evaluación.

NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (11/04/2023 12:41)
<https://sede.xunta.gal/cve?dcve=SAOC-D4G4-BOAH-OF4O-TQM9-GGLP-TDUE-D168-1209-6846-63>



Comité Territorial de Santiago y Lugo
XERENCIA DO SERVIZO GALEGO DE SAÚDE
Complexo Administrativo de San Lázaro
15781 Santiago de Compostela
T. 881 546425 ceic@sergas.gal



<https://acis.sergas.es/cartafo/Redes-de-Comites-de-Etica-da-Investigacion>

ANEXO I: Composición del Comité de Ética de la investigación Santiago-Lugo (CEI S-L)

Presidenta	Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
Vicepresidenta	M^a Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría.
Secretaria	Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia.
Vicesecretaria	Catalina Caamaño Isorna. Farmacéutica de Atención Primaria.
Vocales	M^a Cristina Arijón Barazal. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
	Raúl Franco Gutiérrez. Médico especialista en Cardiología.
	Jesús Fernández Álvarez. Miembro lego.
	Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho.
	Ana M^a Hermida Cao. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria
	Eva Marcos Doldán. Analista-programadora.
	Jesús Prego Domínguez. Enfermero.
	Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica. Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (11/04/2023 12:41)
<https://sede.xunta.gal/cve?dcve=SAOC-D4G4-BOAH-OF4O-TQM9-GGLP-TD0E-D168-1209-6846-63>



<https://acis.sergas.es/cartafo/Redes-de-Comites-de-Etica-da-Investigacion>

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (11/04/2023 12:41)
<https://sede.xunta.gal/cve?dove=SAOC-D4G4-BOAH-OF40-TQM9-GGLP-TD0E-D168-1209-6846-63>





Los factores perinatales son clave en el desarrollo de la obesidad. La lactancia materna prolongada protege contra la obesidad al aumentar la producción hepática de FGF21, el cual actúa en el hipotálamo lateral, activa la termogénesis y reduce el peso corporal. En este trabajo empleamos técnicas de transcriptómica y proteómica para identificar otros mecanismos protectores de la lactancia contra la obesidad. Entre los factores modificados, seleccionamos y estudiamos KLF15 y ANGPTL4, y describimos un nuevo mecanismo por el cual el FGF21 hepático aumenta los niveles de ANGPTL4 en hipotálamo lateral. Este estudio abre nuevas líneas de investigación sobre los efectos de la lactancia prolongada en el metabolismo energético e identifica posibles dianas terapéuticas novedosas para el tratamiento de la obesidad.