



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Verónica Lorena  
Peña León

Tesis doctoral

La lactancia materna  
prolongada protege contra la  
obesidad inducida por la dieta a  
través de la interacción entre  
FGF21 y el sistema  
dopaminérgico en el hipotálamo

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Endocrinología





TESE DE DOUTORAMENTO

**LA LACTANCIA MATERNA  
PROLONGADA PROTEGE CONTRA  
LA OBESIDAD INDUCIDA POR LA  
DIETA A TRAVÉS DE LA  
INTERACCIÓN ENTRE FGF21 Y EL  
SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN EL  
HIPOTÁLAMO**

Verónica Lorena Peña León

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOGÍA



SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2022



D./Dna. **Verónica Lorena Peña León**

Título da tese: **La lactancia materna prolongada protege contra la obesidad inducida por la dieta a través de la interacción entre FGF21 y el sistema dopaminérgico en el hipotálamo**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela, 1 de Enero de 2022.**

**Sinatura electrónica**





## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **Rubén Nogueiras Pozo**

En condición de: **Titor/a e director/a**

Título da tese: **La lactancia materna prolongada protege contra la obesidad inducida por la dieta a través de la interacción entre FGF21 y el sistema dopaminérgico en el hipotálamo.**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Verónica Lorena Peña León, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 1 de Enero de 2022**

**Sinatura electrónica**







## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **Luisa María Seoane Camino**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **La lactancia materna prolongada protege contra la obesidad inducida por la dieta a través de la interacción entre FGF21 y el sistema dopaminérgico en el hipotálamo.**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Verónica Lorena Peña León, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 20 de Decembro de 2021

**Sinatura electrónica**





*A mi padre, Edgar*

*Por siempre creer en mí, enseñarme que todo se consigue con esfuerzo y perseverancia  
y dejarme volar sin soltarme (como una cometa).*

*A mi madre, Ligia*

*Por enseñarme a luchar por mis sueños, por hacer de mí una mujer responsable  
y por todo su apoyo constante.*



## AGRADECIMIENTOS

Echar la vista atrás y definir en qué momento decidí hacer un doctorado, es difícil, ya que con solo 5 años me presentaba como la “*Doctora Peña*”, y tras muchos años puedo decir que estoy a punto de hacerlo realidad.

Pero esto no habría sido posible, si hace casi 6 años no hubiese recibido una llamada, en la que me preguntaron si seguía interesada en hacer un doctorado, y sin pensarlo mucho, decidí cruzar España, desde Cádiz a Santiago de Compostela para conseguirlo. Por ello empiezo mis agradecimientos con Dra. Luisa María Seoane Camino (Sisi), mi directora de tesis, gracias por haberme brindado esta oportunidad, por todo lo que me enseñaste durante estos años, y por confiar en mí para desarrollar mi tesis en tu grupo de investigación. También agradezco al Prof. Rubén Nogueiras, codirector de mi tesis, por todo el apoyo, por las excelentes enseñanzas de ciencia que me trasmitiste y cada palabra de ánimo.

También me gustaría agradecer al Dr. Miguel Fidalgo, Dr. Vicent Prevot, Dra. Guadalupe Sabio, Dr. Felipe Casaveva, Dra. Rosaura Leis, Dra. Sulay Tovar, Dr. Miguel López, con los que pudimos colaborar en el desarrollo de varios experimentos a lo largo de mi etapa predoctoral. Así mismo gracias por el apoyo a Ana Senra, Ana Torres, Bernardo, Noemi y demás personal técnico que fueron de gran apoyo en varios procedimientos, con eficacia y amabilidad.

Durante este tiempo pude crecer en lo profesional, y más aún en lo personal, trabajando con gente muy diversa, de la que me gustaría resaltar a tres grandes personas, que me hicieron esta etapa mucho más fácil y agradable, Ceci, Cintia y Silvia. Sin duda gran parte de mi trabajo, lo pude realizar por el apoyo de la mejor técnico, Ceci, gracias por todo lo profesional, pero más aún por tu empatía, fuiste mi gran apoyo en el laboratorio, gracias por no dejar que me rinda en algunos momentos, y siempre con un buen consejo y un abrazo a tiempo, sobre todo en los días de “aburrimiento”. Cintia, gracias por ser mi compañera en el laboratorio y muchas veces incluso acompañante en urgencias, eres una gran científica, y mejor persona, gracias por todo lo que me enseñaste de ciencia, por el ánimo que me diste, y por ESTAR siempre, aun cuando ya no estabas físicamente. También quiero agradecer a Silvia, por haberme enseñado la manera correcta de hacer ciencia y tu “espabila” en el momento justo, por las comidas y experimentos compartidos.

También me gustaría agradecer a Raquel por su ayuda en estos últimos años en el laboratorio, y a Omar por los últimos meses compartidos en el laboratorio, a Rocío de Pediatría con la que colaboramos, los chicos de Onco con los que compartimos los primeros años y demás compañeros del IDIS, y los chicos POLES del CIMUS, fundamentalmente a Dani, con el que compartí largas horas de animalario y tostadas con tomate, gracias por toda tu ayuda, así mismo Natalia, Cris, Violeta y todos aquellos con los que compartí varios experimentos en estos años en Santiago.

Ahora me gustaría agradecer profundamente a las personas que siempre me han apoyado, en cada decisión y han creído en mí.

De manera muy especial quiero agradecer a mi esposo, Edwin, con quién empecé esta aventura, mi compañero de viaje y de vida, gracias porque sin dudarlo me acompañaste a lograr mi objetivo, aun cuando tuviste que cambiar tu sitio de trabajo, gracias por ser mi mayor apoyo y no dejarme rendir, recordándome día a día que yo puedo y por ser el primero en alegrarte, aun antes de que lo consiga.

A mi padre, porque me demostró y enseñó que, aunque la vida se complique, siempre se puede conseguir lo que se propone, a base de mucho trabajo, esfuerzo y constancia, por todo tu amor y apoyo incondicional.

A mi madre, que nunca se rinde, y es un ejemplo de superación, gracias por tu preocupación y amor, por animarme constantemente a conseguir mis sueños y enseñarme a ser responsable y nunca rendirme.

Gracias también a toda mi familia, en especial a mis hermanos, Javi y Jonathan por estar siempre, en cada momento que los he necesitado, y como ellos dicen ¡ahora si puedo dedicarme a crecer!, también a Yadi por siempre animarme y su cariño a pesar de la distancia; con todo mi cariño quiero agradecer a Montse por haber estado muy de cerca y el ánimo que me transmitiste, aquí está la prueba de que todo se puede conseguir, y que no es fácil, pero tampoco imposible. También me gustaría agradecer a David Marcelo, Beatriz, Jesenia, David Fernando, Diana, Amira, Carmen, por estar pendientes siempre y por todo el ánimo y cariño, y como no, a los pequeños de la familia que me han alegrado mis días con sus ocurrencias Martín, Alejandro, Emili, Gerard, Noe, Casandra. Así mismo a mis amigos, en especial Pao y Malú, que siempre me han transmitido palabras de ánimo y por escucharme, sin importar si entendían o no de lo que hablaba.

GRACIAS A TODOS, porque de una u otra manera, me han facilitado las cosas para que esta tesis llegue a un feliz término.

# **LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA PROTEGE CONTRA LA OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN ENTRE FGF21 Y EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN EL HIPOTÁLAMO**

## **RESUMEN**

Los eventos que tienen lugar en períodos tempranos de la vida podrían ser determinantes en el desarrollo de obesidad. Mientras que el efecto de la nutrición materna sobre las crías ha sido ampliamente estudiado, los efectos de la nutrición de las crías, especialmente de la lactancia materna en la reprogramación del metabolismo en la infancia/adulthood siguen siendo desconocidos. Partiendo del diseño de un modelo animal de lactancia materna prolongada, investigamos si ésta provocaría cambios persistentes en la homeostasis energética, e investigamos los mecanismos moleculares subyacentes. Los resultados indican que el destete retrasado en las crías las protege contra la obesidad inducida por la dieta en la edad adulta, a través de un aumento de la termogénesis del tejido adiposo marrón y del gasto energético. Estos efectos de la lactancia prolongada están mediados por el aumento en la producción hepática de FGF21 y de su acceso al hipotálamo. A nivel central, FGF21 activa las neuronas GABAérgicas que expresan el receptor 2 de la dopamina en el núcleo lateral hipotalámico y la zona incerta. Concluimos que la lactancia materna prolongada protege frente a la obesidad a través de cambios fisiológicos duraderos que involucran la comunicación entre hígado, hipotálamo y tejido adiposo marrón.



# **PROLONGED BREASTFEEDING PROTECTS AGAINST DIET-INDUCED OBESITY THROUGH THE INTERACTION BETWEEN FGF21 AND THE DOPAMINERGIC SYSTEM IN THE HYPOTHALAMUS**

## **ABSTRACT**

Events occurring early in life may be determinants in the development of obesity. While the effect of maternal nutrition on offspring has been extensively studied, the effects of offspring nutrition, especially breastfeeding, on metabolic reprogramming in childhood/adulthood remain unknown. Based on the design of an animal model of prolonged breastfeeding, we investigated whether prolonged breastfeeding would lead to persistent changes in energy homeostasis and investigated the underlying molecular mechanisms. The results indicate that delayed weaning in offspring protects them against diet-induced obesity in adulthood through increased brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. These effects of prolonged lactation are mediated by increased hepatic production of FGF21 and its access to the hypothalamus. Centrally, FGF21 activates GABAergic neurons expressing dopamine receptor 2 in the lateral hypothalamic area and zona incerta. We conclude that prolonged breastfeeding protects against obesity through long-lasting physiological changes involving communication between liver, hypothalamus and brown adipose tissue.



## **A LACTACIÓN MATERNA PROLONGADA PROTEXE CONTRA A OBESIDADE PRODUCIDA POLA DIETA O TRAVÉS DA INTERACCIÓN ENTRE FGF21 E O SISTEMA DOPAMINÉRXICO NO HIPOTÁLAMO.**

### **RESUMO**

Os eventos que teñen lugar nos períodos temperáns da vida poderían ser determinantes no desenvolvemento da obesidade. Mentres que o efecto da nutrición materna sobre as crías foi ampliamente estudado, os efectos da nutrición das crías, especialmente da lactancia materna na reprogramación do metabolismo infancia/adulthood seguen sendo descoñecidos. Partindo do deseño dun modelo animal de lactación materna prolongada, investigamos se esta produciría cambios persistentes na homeostase enerxética, e investigamos os mecanismos moleculares subxacentes. Os resultados amosan que o destete retrasado nas crías protéxeas fronte a obesidade inducida pola dieta na idade adulta, a través de un aumento da termoxénese do tecido adiposo marrón e do gasto enerxético. Estes efectos da lactación prolongada están mediados polo aumento da produción hepática de FGF21 e do seu acceso ó hipotálamo. A nivel central, FGF21 activa as neuronas GABAérxicas que expresan o receptor 2 da dopamina na área hipotalámica lateral e na zona incerta. Concluimos que a lactación materna prolongada protexe fronte á obesidade a través de cambios fisiolóxicos duradeiros que involucran a comunicación entre fígado, hipotálamo e tecido adiposo marrón.



# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>31</b>
<b>1. OBESIDAD</b>	<b>33</b>
1.1. OBESIDAD INFANTIL	34
1.2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD	34
1.3. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD	35
<b>2. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA</b>	<b>36</b>
<b>3. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b>	<b>36</b>
3.1. NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS	37
3.1.1. NÚCLEO ARCUATO HIPOTALÁMICO	37
3.1.2. NÚCLEO VENTROMEDIAL HIPOTALÁMICO	38
3.1.3. NÚCLEO DORSOMEDIAL HIPOTALÁMICO	38
3.1.4. NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÁMICO	38
3.1.5. NÚCLEO LATERAL HIPOTALÁMICO	38
3.2. SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO	40
3.3. RECEPTOR DE DOPAMINA 2	40
3.4. TRANSPORTE DE HORMONAS Y METABOLITOS AL HIPOTÁLAMO	42
<b>4. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR HORMONAS PERIFÉRICAS QUE ACTÚAN SOBRE EL SNC</b>	<b>43</b>
4.1. TEJIDO ADIPOSO	43
4.1.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO	44
4.1.2. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN	45
4.2. TERMOGÉNESIS Y <i>BROWNING</i>	46
4.3. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21	48
<b>5. LACTANCIA MATERNA</b>	<b>51</b>
5.1. LECHE MATERNA Y SU COMPOSICIÓN	51
5.1.1. ADIPONECTINA	52
5.1.2. LEPTINA	52
5.1.3. INSULINA	53
5.1.4. GHRELINA	53
5.1.5. FGF21	53
5.2. INFLUENCIA DE LA LACTANCIA MATERNA Y LA INTRODUCCIÓN DE ALIMENTOS EN LA OBESIDAD	55
5.3. INFLUENCIA DEL PESO DE LA MADRE EN LA OBESIDAD DE LA DESCENDENCIA	55

<b>HIPÓTESIS</b>	<b>57</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>65</b>
<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>67</b>
<b>2. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>68</b>
<b>2.1. MODELO DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA</b>	<b>68</b>
<b>2.2. MODIFICACIÓN DE LA DIETA RATAS CON LACTANCIA ESTÁNDAR</b>	<b>69</b>
<b>2.3. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE FGF21 EN EL HÍGADO DEL MODELO DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA</b>	<b>69</b>
<b>2.4. ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE FGF21 EN RATAS ESTÁNDAR</b>	<b>70</b>
<b>2.5. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE D2R EN EL LHA/ZI DEL MODELO DE LACTANCIA PROLONGADA</b>	<b>71</b>
<b>2.6. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DEL D2R EN EL LHA/ZI DE RATAS CON DIETA CONTROL TRATADOS CON FGF21 ICV</b>	<b>71</b>
<b>2.7. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE D2R EN EL LHA/ZI DE RATONES D2R-CRE DEPENDIENTE TRATADOS CON FGF21 ICV</b>	<b>72</b>
<b>2.8. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE FGFR1 EN EL LHA/ZI EN RATONES D2RCRE TRATADOS CON FGF21 ICV</b>	<b>72</b>
<b>2.9. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DEL D2R EN EL LHA/ZI DE RATONES VGAT-CRE TRATADOS CON FGF21 ICV</b>	<b>73</b>
<b>2.10. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE FGFR1 EN TANICITOS DE RATONES WT</b>	<b>73</b>
<b>3. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIA</b>	<b>74</b>
<b>3.1. VÍA INTRAPERITONEAL</b>	<b>74</b>
<b>3.2. VÍA SUBCUTÁNEA</b>	<b>74</b>
<b>3.3. VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR</b>	<b>74</b>
<b>3.4. CANULACIÓN</b>	<b>74</b>
<b>3.5. VÍA INTRAVENOSA</b>	<b>75</b>
3.5.1. ADMINISTRACIÓN POR LA VENA DE LA COLA	75
3.5.2. ADMINISTRACIÓN POR LA VENA YUGULAR	75
<b>3.6. VÍA NÚCLEO-ESPECÍFICA</b>	<b>75</b>
3.6.1. ESTEREOTAXIA	76
<b>4. ANESTESIA</b>	<b>77</b>
<b>5. PROCEDIMIENTOS</b>	<b>77</b>
<b>5.1. MONITORIZACIÓN DE PESO E INGESTA</b>	<b>77</b>
<b>5.2. MONITORIZACIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL E INTERESCAPULAR</b>	<b>77</b>
<b>5.3. FENOTIPADO METABÓLICO</b>	<b>77</b>
5.3.1. SISTEMA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	77

5.3.2.	SISTEMA DE CALORIMETRÍA INDIRECTA	78
<b>5.4.</b>	<b>TEST DE EXPOSICIÓN AL FRÍO</b>	<b>78</b>
<b>5.5.</b>	<b>PRUEBA DE TOLERANCIA AL PIRUVATO, A LA GLUCOSA Y A LA INSULINA</b>	<b>78</b>
<b>5.6.</b>	<b>ESTUDIO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN BAT</b>	<b>79</b>
<b>5.7.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE LECHE MATERNA</b>	<b>79</b>
<b>5.8.</b>	<b>PERFUSIÓN CARDIACA</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>SACRIFICIO</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>TÉCNICAS ANALÍTICAS</b>	<b>80</b>
<b>7.1.</b>	<b>DISECCIÓN DE ÁREAS CEREBRALES</b>	<b>80</b>
<b>7.2.</b>	<b>ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>81</b>
7.2.1.	UCP1 EN BAT	81
7.2.2.	<i>OIL RED</i> EN HÍGADO	81
7.2.3.	INMUNOFUORESCENCIA EN CORTES CEREBRALES	81
<b>7.3.</b>	<b>NIVELES DE FGF21 EN PLASMA Y LECHE</b>	<b>82</b>
<b>7.4.</b>	<b>NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA</b>	<b>82</b>
<b>7.5.</b>	<b>ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO POR PCR A TIEMPO REAL</b>	<b>82</b>
7.5.1.	EXTRACCIÓN DEL ARN Y CUANTIFICACIÓN	82
7.5.2.	PURIFICACIÓN DEL ARN: TRATAMIENTO CON DNASAS	82
7.5.3.	RETROTRANSCRIPCIÓN	83
7.5.4.	PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	83
<b>7.6.</b>	<b>CLASIFICACIÓN FACS</b>	<b>84</b>
<b>7.7.</b>	<b>ANÁLISIS DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT</b>	<b>84</b>
7.7.1.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTALES	84
7.7.2.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTALES	85
7.7.3.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE	85
7.7.4.	ELECTROFORESIS	85
7.7.5.	TRANSFERENCIA	86
7.7.6.	TINCIÓN CON ROJO PONCEAU	87
7.7.7.	INMUNODETECCIÓN	87
<b>8.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS COMERCIALES</b>	<b>89</b>
	<b>RESULTADOS</b>	<b>93</b>
<b>1.</b>	<b>LA LACTANCIA MATERNA PREVIENE LA OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA MEDIANTE EL INCREMENTO DEL GASTO ENERGÉTICO Y LA TERMOGÉNESIS</b>	<b>95</b>
1.1.	LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA ACTIVA LA TERMOGÉNESIS DESDE EL DESTETE HASTA LA EDAD ADULTA	95
1.2.	LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA MEJORA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA	100
1.3.	LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA ACTIVA LA TERMOGÉNESIS TANTO EN CONDICIONES DE TERMONEUTRALIDAD COMO EN EXPOSICIÓN A FRÍO	101

1.4.	LA LACTANCIA PROLONGADA ACTIVA LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR EL BAT	102
<b>2.</b>	<b><u>FGF21 CONTRIBUYE A LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA LACTANCIA MATERNA SOBRE EL METABOLISMO</u></b>	<b>105</b>
2.1.	EN RATAS CON LACTANCIA MATERNA PROLONGADA EXISTE UN INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE FGF21 HEPÁTICO	105
		106
2.2.	LA SEMANA ADICIONAL DE LACTANCIA NO AFECTA A LOS NIVELES DE FGF21 CIRCULANTES NI EN LECHE DE LAS MADRES DEL MODELO DE LACTANCIA PROLONGADA	106
2.3.	LA INHIBICIÓN DE FGF21 HEPÁTICO REVIERTE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA LACTANCIA MATERNA	107
<b>3.</b>	<b><u>EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOTALÁMICO ESTÁ INVOLUCRADO EN LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA LACTANCIA MATERNA SOBRE EL METABOLISMO</u></b>	<b>111</b>
3.1.	EN RATAS CON LACTANCIA MATERNA PROLONGADA EXISTE UN INCREMENTO DE D2R EN LHA/ZI	111
3.2.	LOS NIVELES ELEVADOS DE FGF21 QUE SE PRODUCEN CON LA LACTANCIA PROLONGADA CONTRIBUYEN A LA ACTIVACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS POR EL BAT A TRAVÉS DE SU ACCIÓN SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOTALÁMICO.	111
3.3.	LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE FGF21 REPRODUCE LOS EFECTOS DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA E INDUCE UN AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE D2R EN EL LHA/ZI	112
3.4.	LA INHIBICIÓN DEL D2R EN EL LHA/ZI BLOQUEA LOS EFECTOS PROTECTORES DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA	114
3.5.	LA ACTIVACIÓN DE D2R EN LHA/ZI INDUCIDA POR FGF21 ES NECESARIA PARA LAS ACCIONES BIOLÓGICAS DE FGF21 SOBRE LA TERMOGÉNESIS	118
3.6.	LOS EFECTOS DE FGF21 SOBRE LAS NEURONAS D2R EN LHA/ZI SE PRODUCEN A TRAVÉS DE FGFR1	123
3.7.	EL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE FGF21 EN HÍGADO REDUCE LA RESPUESTA TERMOGÉNICA INDUCIDA POR FRÍO Y REDUCE LA EXPRESIÓN DE D2R EN LHA/ZI	125
3.8.	LOS EFECTOS METABÓLICOS DE FGF21 ESTÁN MEDIADOS POR LAS NEURONAS GABAÉRGICAS DEL LHA/ZI QUE EXPRESAN D2R	125
<b>4.</b>	<b><u>LOS TANICITOS DE LA EMINENCIA MEDIA TRASPORTAN EL FGF21 PRODUCIDO A NIVEL HEPÁTICO AL HIPOTÁLAMO</u></b>	<b>128</b>
4.1.	EL FGF21 PERIFÉRICO ACCEDE A LOS TANICITOS DE LA ME	128
4.2.	EL TRASPORTE DE FGF21 PERIFÉRICO SE EFECTÚA POR MEDIO DE LOS TANICITOS DE LA ME	129
	<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>133</b>
	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>141</b>
	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>145</b>
	<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>163</b>

# **ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS**



**ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS**

- AAV:** adenovirus adeno-asociado, *adeno-associated viruses*
- ABCD:** enfermedad crónica basada en la adiposidad, *adiposity based chronic disease*
- Ad:** adenovirus, *adenovirus*
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ADN complementario
- AgRP:** péptido similar a agoutí, *a agouti related protein*
- ALADINO:** alimentación, actividad física, desarrollo infantil y obesidad
- AMP:** adenosín monofosfato, *adenosine monophosphate*
- AMPK:** proteína quinasa activada por AMP, *AMP-activated protein kinase*
- ANCOVA:** análisis de la covarianza
- ANOVA:** análisis de la varianza
- AP:** anteroposterior
- APS:** persulfato amónico, *ammonium persulphate*
- ARC:** núcleo arcuato hipotalámico, *arcuate hypothalamic nucleus*
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ATP:** adenosín trifosfato, *adenosine triphosphate*
- BAT:** tejido adiposo marrón, *brown adipose tissue*
- BC:** bromocriptina
- BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro, *brain-derived neurotrophic factor*
- BHE:** barrera hematoencefálica
- Browning:** pardeamiento, capacidad de transformar los adipocitos blancos en beige
- BSA:** albúmina de suero bovino, *bovine serum albumin*
- CART:** transcrito regulado por cocaína y anfetamina, *Cocaine and amphetamine-regulated transcript*
- CD:** dieta control, *control diet*
- CEEA:** Comité de Ética en Experimentación Animal
- COSI:** iniciativa de vigilancia de la obesidad infantil, *childhood obesity surveillance initiative*
- CRH:** hormona liberadora de corticotropinas, *corticotrophin-releasing hormone*
- CT:** tomografía computarizada, *computed tomography*
- Ct:** umbral de ciclos, *cycle threshold*
- DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol
- DEPC:** dietilpirocarbonato, *diethyl pyrocarbonate*
- DIO:** obesidad inducida por dieta, *diet induced obesity*
- DMH:** núcleo dorsomedial hipotalámico, *dorsomedial hypothalamic nucleus*
- DMT2:** diabetes mellitus tipo 2
- DNasa:** desoxirribonucleasa, *deoxyribonuclease*
- dNTPs:** deoxinucleósidos trifosfato, *deoxynucleotide triphosphates*
- DV:** dorsoventral
- DW:** lactancia prolongada y destete retrasado, *delay weaning*
- D2R:** receptor de dopamina 2, *dopamine 2 receptor*
- EASO:** asociación europea para el estudio de la obesidad, *the european asociation for the study of obesity*
- EE:** gasto energético, *energy expenditure*
- EGFP:** proteína fluorescente verde mejorada, *enhanced green fluorescent protein*
- ELISA:** enzimoimmunoensayo, *enzyme-linked immunosorbent assay*

**ENT:** enfermedades no transmisibles  
**FACS:** clasificador celular activado por fluorescencia, *fluorescence-activated cell sorter*  
**FDG:** fluorodesoxiglucosa, *fluorodeoxyglucose*  
**FGF21:** factor de crecimiento de fibroblastos 21, *fibroblast growth factor 21*  
**FGFR1:** receptor 1 de FGF21, *FGF21 Receptor 1*  
**FOV:** campo de visión, *field of view*  
**FRET:** resonancia de transferencia de energía fluorescente, *Resonance Energy Transfer*  
**GABA:** ácido gamma aminobutírico, *gamma amino butyric acid*  
**GFP:** proteína fluorescente verde, *green fluorescent protein*  
**GTT:** prueba de tolerancia a la glucosa, *glucose tolerance test*  
**HDAC3:** histona desacetilasa 3, *histone deacetylase 3*  
**HFD:** dieta alta en grasa, *high fat diet*  
**HPRT1:** fosforribotransferasa hipoxantina 1, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*  
**ICV:** intracerebroventricular  
**IMC:** índice de masa corporal  
**IL6:** interleuquina 6, *interleukin 6*  
**IP:** intraperitoneal  
**ITT:** prueba de tolerancia a la insulina, *insulin tolerance test*  
**IV:** intravenoso  
**JAK-STAT:** Janus quinasa -transductor de señal y activador de la transcripción, *Janus kinase -signal transducer and activator of transcription*  
**KD:** silenciado, *knockdown*  
**KO:** delecionado, *knockout*  
**L:** mediolateral  
**LA:** actividad locomotora, *locomotor activity*  
**LEPR:** receptor de leptina, *leptine receptor*  
**LHA:** núcleo lateral hipotalámico, *lateral hypothalamic nucleus*  
**MBH:** núcleo mediobasal (VMH+ARC) hipotalámico, *mediobasal hypothalamic nucleus*  
**MCH:** hormona concentradora de melanina, *melanin concentrating hormone*  
**MCHR1/2:** receptor de MCH 1/2, *MCH receptor 1/2*  
**MC3/4R:** receptores de melanocortinas 3/4, *melanocortin receptors 3/4*  
**ME:** eminencia media, *median eminence*  
**microARN:** micro ácido ribonucleico  
**MLEM:** maximización de la expectativa de máxima verosimilitud, *maximum likelihood expectation maximisation*  
**NE:** norepinefrina, *norepinephrine*  
**NEFA:** ácido graso no esterificado, *non-esterified fatty acid*  
**NPY:** neuropéptido Y, *neuropeptide Y*  
**OCDE:** organización para la cooperación y el desarrollo económico  
**OMS:** organización mundial de la salud (WHO “world health organization”)  
**OX:** orexina, *orexin*  
**OX-A/B:** orexina A/B, *orexin A/B*  
**OX-1R:** receptor de orexina 1, *orexin 1 receptor*  
**OX-2R:** receptor de orexina 2, *orexin 2 receptor*  
**PBS:** solución salina tamponada con fosfato, *phosphate buffered saline*  
**PBST:** solución salina tamponada con fosfato, 0,1% detergente Tween® 20, *phosphate-Buffered Saline, 0,1% Tween® 20 detergent*  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*

## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

- PET:** tomografía por emisión de positrones, *positron emission tomography*  
**PET-CT:** tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada, *positron emission tomography-computed tomography*  
**PFU:** unidades formadoras de placa, *plate-forming units*  
**PGC1 $\alpha$ :** coactivador 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$ , *PPAR $\gamma$  coactivator 1 alpha*  
**POMC:** proopiomelanocortina, *proopiomelanocortin*  
**PPAR $\alpha$ :** receptor activado por proliferador de peroxisomas  $\alpha$ , *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*   
**PTT:** prueba de tolerancia al piruvato, *piruvato tolerance test*  
**PVDF:** fluoruro de polivinilideno, *polyvinylidene fluoride*  
**PVH:** núcleo paraventricular hipotalámico, *paraventricular hypothalamic nucleus*  
**qPCR:** PCR cuantitativa, *PCR quantitative*  
**RIPA:** tampón de lisis de radioinmunoprecipitación, *radioimmunoprecipitation lysis buffer*  
**ROS:** especies reactivas del oxígeno, *reactive species of oxygen*  
**RQ:** tasa de respiración metabólica, *respiratory quotient*  
**SB:** tampón de carga, *sample buffer*  
**SC:** subcutáneo, *subcutaneous*  
**SDS:** dodecil sulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate*  
**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*  
**SEM:** error estándar de la media, *standard error of the mean*  
**SF1:** factor esteroideogénico 1, *steroidogenic factor-1*  
**shRNA:** ácido ribonucleico de cadena corta, *short hairp ribonuclei acid*  
**SIRT1:** sirtuina 1, *sirtuin 1*  
**SNC:** sistema nervioso central  
**SNS:** sistema nervioso simpático  
**SUV:** valor de absorción estandarizado, *standardised uptake value*  
**SW:** lactancia estándar y destete estándar, *standard weaning*  
**TEMED:** tetrametiletilendiamina, *tetramethylethylenediamine*  
**TG:** triglicéridos, *triglycerides*  
**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$*   
**TRH:** hormona liberadora de tirotrópina, *thyrotropin-releasing hormone*  
**Tris:** Hidrocloruro de tris (hidroximetil) aminometano, *tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*  
**T3:** triyodotironina, *triiodothyronine*  
**UCP1:** proteína de desacoplamiento 1, *uncoupling protein-1*  
**UE:** unión europea  
**vCO<sub>2</sub>:** volumen de dióxido de carbono  
**VMH:** núcleo ventromedial hipotalámico, *ventromedial hypothalamic nucleus*  
**vO<sub>2</sub>:** volumen de oxígeno  
**WAT:** tejido adiposo blanco, *white adipose tissue*  
**WT:** fenotipo salvaje, *wild type*  
**ZI:** zona incerta, *zona incerta*  
 **$\beta$ 3-ARs:** receptores adrenérgicos  $\beta$ 3,  *$\beta$ 3-adrenergic receptors*  
**18F-FDG:** fluorodesoxiglucosa (2-[18F]-fluoro-2-deoxi-D-glucosa)



# INTRODUCCIÓN



## 1. OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Actualmente la obesidad es prevalente tanto en países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. La obesidad es uno de los mayores desafíos de salud pública del siglo XXI, ya que el número de afectados continúa aumentando a un ritmo alarmante, provocando al menos 2,8 millones de muertes cada año.

Según la OMS se ha estimado que entre 1975 y 2016, la prevalencia mundial de la obesidad se ha casi triplicado, en 2016 más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. En general, en 2016 alrededor del 13 % de la población adulta mundial (un 11 % de los hombres y un 15 % de las mujeres) eran obesos.

En la sociedad actual se ha producido un aumento a la accesibilidad de los alimentos ultraprocesados e hipercalóricos, junto con un bajo gasto energético (EE) característico del estilo de vida moderno, donde encontramos cada vez más sedentarismo debido a muchas formas de trabajo, nuevos modos de transporte y la creciente urbanización. Por todo ello desde la OMS se han realizado acuerdos para intentar frenar el sobrepeso y la obesidad a nivel mundial. Ya en 2004 la Asamblea Mundial de la Salud adoptó la “Estrategia Mundial de la OMS sobre Dieta, Actividad Física y Salud” y en 2011 se reconoció de nuevo en una declaración política sobre las enfermedades no transmisibles (ENT). Esta estrategia describe las acciones necesarias para apoyar las dietas saludables y la actividad física regular, e insta a tomar medidas a nivel mundial, regional y local para mejorar las dietas y los patrones de actividad física a nivel poblacional. Además, el “Plan de acción mundial sobre la actividad física 2018-2030: personas más activas para un mundo más saludable” proporciona acciones políticas eficaces y factibles para aumentar la actividad física en todo el mundo.

A nivel europeo este aumento también se refleja, donde la prevalencia de sobrepeso y obesidad en el año 1975 eran aproximadamente del 10 y el 5 % respectivamente, mientras que en 2016 estos valores se han triplicado [1]. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) en 2019 publicó un informe titulado “*The heavy burden of obesity*”, en el que se presentan los datos de prevalencia de sobrepeso y obesidad de 52 países, ordenados en *rankings*, en la que se informa que en España la prevalencia de obesidad y sobrepeso en adultos es del 53 % [2].

La obesidad es por tanto un proceso de enfermedad frecuente, grave, complejo, recurrente y crónico que representa un importante problema de salud pública. La acuñación de la obesidad como una enfermedad crónica basada en la adiposidad (ABCD) es de particular relevancia en línea con la propuesta de “*The European Association for the Study of Obesity*” (EASO) de mejorar los criterios diagnósticos de la Clasificación Internacional de Enfermedades para la obesidad en función de tres dimensiones: etiología, grado de adiposidad, y riesgos para la salud. El índice de masa corporal (IMC) como medida única de la obesidad no refleja toda la complejidad de la enfermedad. Las complicaciones de la obesidad están determinadas principalmente por dos procesos patológicos, es decir, las fuerzas físicas (enfermedad de la masa grasa) y las respuestas endocrinas e inmunitarias (enfermedad de la grasa enferma), que están **incrustadas** en un contexto cultural y físico que conduce a una etapa ABCD específica [3].

### **1.1. OBESIDAD INFANTIL**

La obesidad infantil es un problema aún más impactante, ya que aparte de ser un problema en la infancia, constituye en sí misma un factor de riesgo para ser un adulto con obesidad. Además de estos mayores riesgos futuros, los niños obesos sufren dificultades respiratorias, mayor riesgo de fracturas e hipertensión, y presentan marcadores tempranos de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y efectos psicológicos. Por lo que es importante la detección precoz del exceso de peso y su prevención durante la infancia para lograr mayor impacto en la salud.

Se ha estimado que 41 millones de niños menores de cinco años, y más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) tienen sobrepeso u obesidad. La prevalencia del sobrepeso y la obesidad en niños y adolescentes aumentó de manera similar en ambos sexos: un 18 % de niñas y un 19 % de niños con sobrepeso en 2016, y si se mantienen las tendencias actuales, se prevé que aumentará a 70 millones para 2025 [4].

En este contexto, la Región Europea de la OMS, tras la Conferencia Ministerial Europea contra la Obesidad en 2006, la “*Childhood Obesity Surveillance Initiative*” (COSI), promovió un sistema concordado de vigilancia de la obesidad infantil [5]. España participa en la iniciativa COSI a través del “Estudio de Alimentación, Actividad física, Desarrollo INfantil y Obesidad” (ALADINO) impulsado por el Observatorio de la Nutrición y de Estudio de la Obesidad en cuatro rondas (2011, 2013, 2015 y 2019). Después de los realizados en 2011, 2013 y 2015, en el último trimestre de 2019 se realizó un estudio descriptivo transversal de las medidas antropométricas obtenidas por medición directa y de factores asociados obtenidos mediante cuestionarios en una muestra de 16.665 escolares, representativa de la población escolar de 6 a 9 años residente en España, obtenida de forma aleatoria [6].

En este informe se presenta la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los escolares de 6 a 9 años en España en 2019, según edad y sexo y la descripción de la situación ponderal de los escolares en función del nivel socioeconómico, la actividad física y los hábitos alimentarios. Los resultados muestran una estabilización dentro de la tendencia descendente de la prevalencia de exceso de peso infantil y subrayan la necesidad de seguir impulsando políticas para promover hábitos saludables entre los escolares y su entorno, tanto familiar como escolar, contando con toda la sociedad, para mejorar la salud de los ciudadanos, y muy especialmente de los más jóvenes [6].

### **1.2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD**

Se considera a la obesidad como un trastorno metabólico que conduce a una excesiva acumulación de energía en forma de grasa corporal. Este desequilibrio energético puede ser resultado de la ingesta de energía excesiva a través de la alimentación y/o de la reducción del EE, como consecuencia de un estilo de vida sedentario, por ejemplo, por exceso uso de televisión, del ordenador o de los videojuegos, y una actividad física insuficiente. Además de la energía ingerida, cabe tener en cuenta también la calidad nutricional de los alimentos ingeridos.

La obesidad se ha considerado durante mucho tiempo como el resultado de una falta de disciplina y esfuerzo para reducir la ingesta de calorías y aumentar la actividad física, lo que ha llevado a una estigmatización social relacionada con el peso de las personas afectadas [7]. Sin embargo este es un problema de salud importante porque predispone a los individuos a desarrollar comorbilidades, una serie de ENT, incluyendo hipertensión, dislipidemia, enfermedad coronaria, diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2), accidente cerebrovascular, cáncer y osteoartritis y una esperanza de vida acortada mientras afecta la calidad de vida [8].

Una amplia investigación tanto en humanos como en varios sistemas de modelos murinos en las últimas décadas ha revelado que existe una interacción compleja de genes y factores ambientales que impactan el control del sistema nervioso central (SNC) de la ingesta de alimentos y la energía, siendo la obesidad una patología multifactorial. El SNC desempeña un papel clave en la detección y el control del estado energético del organismo [9], y el hipotálamo en particular, que es el mayor regulador e integrador de la homeostasis energética de todo el cuerpo.

### **1.3. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD**

La prevalencia de sobrepeso y obesidad en nuestra sociedad causa un efecto importante en la salud y representa una importante carga socioeconómica [10]. Por lo que la primera estrategia se basa en la modificación del estilo de vida, adquiriendo hábitos de vida saludable, lo cual implica seguir dietas equilibradas que reduzcan la ingesta calórica, acompañado de ejercicio físico que reduzca el sedentarismo característico de la sociedad actual. Es fundamental que todas las estrategias de tratamiento que se apliquen vayan acompañadas de esta primera línea de intervención [11-15]. La finalidad del cambio en el estilo de vida es reducir la ingesta de energía y aumentar el EE, este nuevo estilo de vida debe mantenerse en el tiempo para que sea efectivo. Sin embargo, estas directrices son difíciles de llevar a cabo para la población con obesidad y generalmente terminan con un efecto rebote y consiguiente aumento de peso adicional [16].

La segunda estrategia es la farmacoterapia, pero su éxito hasta el momento ha sido limitado, ya que una intervención farmacológica efectiva debe proporcionar una pérdida de peso sustancial y evitar efectos adversos. En la actualidad se está trabajando en el desarrollo de nuevos fármacos que actúen a nivel del SNC y/o sobre señales periféricas procedentes del tejido adiposo y del tracto gastrointestinal, y se está centrando en terapias combinadas prometedoras, pero aún es necesario más ensayos controlados formales, siendo el eje intestino-cerebro uno de los objetivos más prometedores en el tratamiento de la obesidad [17-20].

La tercera estrategia son las intervenciones de cirugía bariátrica y metabólica que son respaldadas por muchas sociedades internacionales para ser un tratamiento eficaz para la pérdida de peso, que también ofrece una mejora significativa en las comorbilidades asociadas como DMT2. Esta estrategia se reserva tan solo para los casos de obesidad mórbida. Dado que la cirugía bariátrica es el tratamiento que presenta mayor efectividad frente la obesidad esto sugiere que las señales procedentes del tracto gastrointestinal son cruciales para la regulación del balance energético del organismo [20-22], aunque los enfoques quirúrgicos son métodos eficaces para combatir la obesidad, las limitaciones de estas intervenciones hacen que estén restringidas a una pequeña porción de la población obesa [21, 23]. Todos estos hechos promueven la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos.

En cuanto a la obesidad infantil la terapia farmacológica es limitada y solo está permitida en niños con edades superiores a 10-12 años, dependiendo del fármaco empleado, mientras que la cirugía bariátrica se realiza tan solo en adolescentes y en casos de obesidad severa, por lo que es fundamental combatir la obesidad infantil con un cambio en el estilo de vida [15, 24, 25].

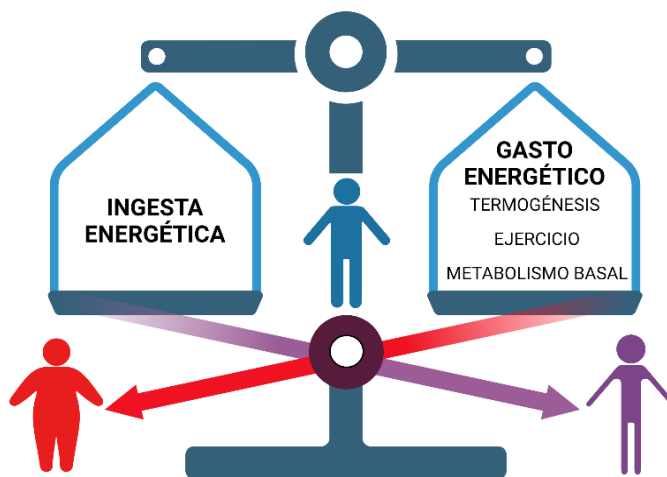
En consonancia con el papel esencial que se cree que desempeñan los acontecimientos neonatales en el neurodesarrollo y en las respuestas conductuales posteriores en la edad adulta, el rápido aumento de la prevalencia de la obesidad también puede ser el resultado de determinantes de la vida temprana [26]. Entre estos determinantes se encuentran la dieta materna y la alimentación neonatal.

## 2. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

En 1860 el fisiólogo Claude Bernard (1813-1878) describió la capacidad que tiene el organismo para mantener y regular sus condiciones internas, fue la primera vez que apareció el concepto de equilibrio del medio interno de un organismo. Este equilibrio es crítico para asegurar el funcionamiento adecuado del cuerpo, puesto que si las condiciones internas están desreguladas, el individuo puede sufrir grandes daños o inclusive la muerte [27].

Posteriormente, en 1929 Walter B. Cannon (1871-1945) acuñó la palabra “homeostasis” (homeo- constante + stasis- mantener) para describir los mecanismos que mantienen constantes las condiciones del medio interno de un organismo, a pesar de grandes oscilaciones en el medio externo. Esto lo encontramos en funciones como la presión sanguínea, temperatura corporal, frecuencia respiratoria y niveles de glucosa sanguínea, entre otras, son mantenidas en un intervalo restringido alrededor de un punto de referencia, sin que influya los cambios de las condiciones externas [28].

La homeostasis es la tendencia de un organismo a mantener un estado interno estable, esto supone que el equilibrio energético entre la energía suministrada y disipada es estable. Para algunos autores, esto significa que las reservas de energía se mantienen constantes a lo largo de la vida útil. Este sistema es perfectamente apropiado en las condiciones ambientales que los seres humanos encontraron durante la mayor parte de su historia. Sin embargo, en las características actuales favorecen alteraciones de la homeostasis, produciendo un desequilibrio en el balance energético del organismo y dando origen a la obesidad (Imagen 1) [29, 30].



**Imagen 1. Balance energético y regulación de la masa corporal.** Esquema general del balance energético. Cuando se produce un desequilibrio se origina la obesidad (mayor ingesta energética) o desnutrición (mayor EE). Fuente: elaboración propia con licencia de BioRender.

## 3. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La homeostasis energética, crucial para el mantenimiento de la salud en un organismo, está controlada con precisión por el SNC que recibe e integra señales de estado energético de la periferia y elabora una respuesta modulando la ingesta de alimentos y el EE [31].

El mantenimiento del peso corporal dentro de los límites saludables, implica el establecimiento del equilibrio entre la energía derivada de la ingesta de alimentos y el EE, regulado por la función homeostática. Esta coordinación requiere un manejo complejo e integrado de las diferentes señales periféricas que están activadas por neurocircuitos ubicados en diferentes áreas del cerebro esenciales para la regulación de la homeostasis energética [32].

El metabolismo energético y la ingesta están regulados por redes neuronales en el SNC, que responden a las señales metabólicas circulantes [33-36].

El principal centro regulador de la homeostasis energética es el hipotálamo que actúa como coordinador en la regulación del metabolismo energético, integrando señales periféricas, señales neuronales de saciedad y del estado nutricional, además de la propia detección de nutrientes. A continuación, procesa estas señales y genera respuestas adecuadas dependiendo del estado energético del organismo [37].

Existen sistemas de regulación a corto y largo plazo para el control de la ingesta. Los sistemas a corto plazo controlan la cantidad de alimento ingerido y el número y duración de las comidas; las señales indicadoras de apetito (ghrelina) y de saciedad (colecistoquinina, péptido similar al glucagón tipo 1, el péptido YY, etc.) son producidas por el tracto gastrointestinal. Por el contrario, las señales indicadoras del estado nutricional a largo plazo permiten asegurar el mantenimiento de los depósitos de energía del organismo y son producidas por el tejido adiposo (leptina, adiponectina, resistina, etc.) [38-40].

El hipotálamo es una pequeña región diencefálica que se localiza debajo del tálamo y que está considerada como el centro neuroendocrino, coordinando comportamientos anorexigénicos y orexigénicos a través de interconexiones de sus poblaciones neuronales con otras regiones cerebrales implicadas en el apetito y la saciedad. Además, regula otras funciones como la temperatura corporal, la secreción hormonal, la reproducción, la lactancia, el ciclo sueño-vigilia, y la función cardiovascular, entre otros [41-43].

### **3.1. NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS**

Desde el punto de vista anatómico, el hipotálamo está organizado en poblaciones neuronales definidas llamados núcleos (Imagen 2). Los núcleos hipotalámicos están interconectados entre sí a través de proyecciones axonales, formando una red de circuitos neuronales que permite realizar un control muy riguroso del metabolismo energético del organismo.

#### **3.1.1. Núcleo arcuato hipotalámico**

El núcleo arcuato (ARC) está situado en la zona ventral del hipotálamo próximo a la eminencia media (ME) donde la barrera hematoencefálica (BHE) es semipermeable. Este hecho permite el paso de numerosas señales circulantes periféricas transportadas por el fluido cerebrospinal, pudiendo así responder rápidamente a fluctuaciones hormonales y nutricionales en el organismo [44].

Este núcleo está constituido por las neuronas anorexigénicas y las neuronas orexigénicas [45]. En términos generales, las neuronas anorexigénicas proopiomelanocortina (POMC) y las neuronas orexigénicas péptido similar a agoutí (AgRP) tiene funciones fisiológicas opuestas y la interacción entre ambas poblaciones neuronales regula el sistema de melanocortinas, responsable de la regulación del apetito y del EE [46]. POMC activa los receptores de melanocortinas mientras que AgRP los inactiva. Además, la mayoría de las neuronas del ARC expresan los receptores de la leptina (LEPR) [47] y de la insulina [48] y ambas hormonas inhiben la actividad de las neuronas NPY (Neuropéptido Y)/AgRP [49]. Por el contrario, estas neuronas son estimuladas por ghrelina [50, 51]. En sentido opuesto, las neuronas POMC/transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) son activadas por leptina e insulina [52, 53] e inhibidas por ghrelina [54].

Las neuronas del ARC están estrechamente conectadas a otras subpoblaciones neuronales especializadas dentro del hipotálamo, pero también a varias regiones cerebrales extra-hipotalámicas, lo que permite una respuesta conductual coordinada [36].

### 3.1.2. Núcleo ventromedial hipotalámico

El núcleo ventromedial (VMH) fue denominado como “centro de la saciedad” en los años 40, al comprobarse que lesiones bilaterales en este núcleo causaban hiperfagia y obesidad. El VMH se caracteriza por ser un elemento integrador de señales periféricas ya que tiene numerosas conexiones neuronales con otros núcleos hipotalámicos y con otras áreas del cerebro implicadas en el comportamiento alimenticio (amígdala, núcleo anterior, ME) y también recibe proyecciones axonales del núcleo ARC [44, 55]. Además, está implicado en un gran número de funciones homeostáticas y comportamentales como el comportamiento sexual femenino, la alimentación, el balance energético y la función cardiovascular [56]. En el VMH se expresa el factor esteroideogénico 1 (SF1) y se ha visto que ratones *knockout* (KO) en este factor de transcripción presentan obesidad e incluso pueden llegar a tener el doble de su masa corporal normal [57]. Asimismo, en el VMH existen neuronas sensibles a la glucosa que responden en situaciones de hipoglucemia y se ha descrito también una elevada expresión de LEPR [56, 58]. Además, en este núcleo se expresa el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que también está implicado en la regulación de la ingesta y la masa corporal [59, 60], la expresión de este factor está regulada por los nutrientes y por señales asociadas a éstos, como son la glucosa y la leptina [61, 62]. Este núcleo además se considera uno de los principales núcleos reguladores del control del EE mediante la modulación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT) por la inhibición de la quinasa activada por AMP (AMPK) [31, 63, 64].

### 3.1.3. Núcleo dorsomedial hipotalámico

El núcleo dorsomedial (DMH) está implicado en múltiples procesos fisiológicos tales como el apetito, la termorregulación, los ritmos circadianos y el estrés [37, 65-67]. Desde el ARC, este núcleo recibe terminaciones axonales de neuronas NPY/AgRP y envía proyecciones al núcleo lateral hipotalámico (LHA), VMH y núcleo paraventricular hipotalámico (PVH) [68, 69].

Las neuronas de este núcleo hipotalámico expresan NPY, y su expresión se incrementa en situaciones de hiperfagia como es la obesidad inducida por dieta (DIO) [70-72]. Recientemente un grupo demostró que el DMH es clave en la respuesta a la obesidad crónica inducida por la dieta [73].

### 3.1.4. Núcleo paraventricular hipotalámico

El PVH está situado en el hipotálamo anterior, en la parte superior del tercer ventrículo. Recibe numerosas proyecciones desde otras regiones hipotalámicas, como de las neuronas AgRP y POMC del ARC [74]; y manda proyecciones hacia el tronco encefálico jugando un papel importante en la modulación de la ingesta. Este núcleo tiene gran importancia como integrador de la homeostasis energética y controla el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides mediante la producción de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la cual presenta propiedades anorexigénicas y participa en la regulación del balance energético [75]. Entre los neuropéptidos sintetizados en el núcleo PVH vinculados con el control de la ingesta destaca la hormona liberadora de corticotropinas (CRH), que tiene efectos anorexigénicos [55]. Además, las neuronas de este núcleo expresan niveles elevados de los receptores de melanocortinas 3 y 4 (MC3/4R) [75].

### 3.1.5. Núcleo lateral hipotalámico

El LHA es central para la orquestación de estados de sueño-vigilia, alimentación, equilibrio energético y comportamiento motivado. Ya desde los años 50 se considera el “centro del hambre” del hipotálamo, ya que lesiones en esta área hipotalámica provocan una reducción en

la ingesta conduciendo en algunos casos a inanición y muerte [76]. Este núcleo se caracteriza por estar formado por poblaciones neuronales que secretan neuropéptidos orexigénicos, tiene gran importancia ya que además de estar implicados en la regulación de la ingesta y el peso corporal, también intervienen en el sistema mesolímbico de recompensa modulando la parte hedónica de la ingesta [77]. Los principales neuropéptidos orexigénicos que se localizan en el LHA son orexina (OX) [24] y la hormona concentradora de melanina (MCH).

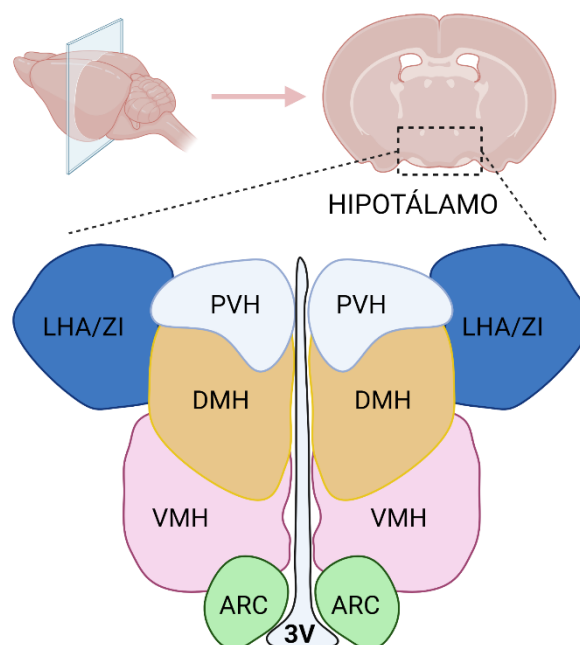
**Neuronas OX:** la OX es un neuropéptido orexigénico que se origina de una preproorexina, que da lugar a dos isoformas, la orexina A (OX-A) y la orexina B (OX-B). Se han identificado dos receptores de OX acoplados a proteína G, el receptor de orexina 1 (OX-1R) y el receptor de orexina 2 (OX-2R) [78]. Se ha descrito que la administración de OX-A y OX-B incrementa la ingesta y que el ayuno produce un incremento en la expresión de preproorexina [42, 78]. Además, la leptina juega un papel muy importante en la regulación de OX, ya que inhibe su actividad [79, 80]. Estas neuronas representan un modulador crucial de la tasa metabólica y de la termogénesis [81], ya que proyectan hacia las neuronas simpáticas del núcleo del rafe pálido incrementando la termogénesis del BAT en ratas [82, 83].

**Neuronas MCH:** estas neuronas son las encargadas de producir la MCH. En humanos se han identificado dos receptores de MCH, MCHR1 y MCHR2, mientras que en roedores solamente se expresa el MCHR1. Se ha demostrado que tanto los animales sometidos a ayuno como animales *ob/ob* (roedor genéticamente que no produce la hormona leptina 1, es extremadamente obeso y tiene muchos de los defectos metabólicos [84]) presentan niveles elevados de MCH y que la inyección de esta hormona en este núcleo incrementa la ingesta de alimentos en ratas [85, 86]. Estos efectos son revertidos por la administración de leptina. Además, se ha descrito que los ratones KO para MCHR1 tienen el EE y la actividad locomotora (LA) incrementados y que son resistentes a la DIO [44, 86, 87], mientras que los ratones que sobreexpresan este neuropéptido son obesos y resistentes a insulina [88].

La MCH es un neuropéptido cíclico de 19 aminoácidos que se sintetiza exclusivamente en el núcleo lateral hipotalámico y en la zona incerta (ZI) y que se ha implicado en la regulación del equilibrio energético [89]. La ZI es una región subtalámica, contigua al LHA, que tiene amplias conexiones en todo el cerebro [90].

Colectivamente, el LHA actúa como un centro para la integración de diversas señales centrales y periféricas y, a través de complejos circuitos de salida locales y de largo alcance, coordina las respuestas de comportamiento adaptativas al medio ambiente. A pesar de los enormes progresos en nuestra comprensión del LHA, definir la identidad de los tipos de células LHA funcionalmente discretos, y sus roles en la conducción de comportamientos complejos, siguen siendo desafíos significativos en el campo [91-94].

El LHA es un centro de varios tipos de células, dividido a grandes rasgos en dos grandes poblaciones relacionadas con la



**Imagen 2. Núcleos hipotalámicos:** ARC, VMH, DMH, PVH, LHA) junto con la ZI.

Fuente: elaboración propia con licencia de BioRender.

alimentación: las neuronas que productoras de glutamato (glutamatérgicas) y las neuronas productoras de ácido gamma aminobutírico (GABAérgicas) [92, 95]. La activación de las neuronas glutamatérgicas conduce a la reducción de la ingesta de alimentos y es aversiva [96]. Por el contrario, la estimulación de las neuronas GABAérgicas es gratificante y produce una ingesta voraz tanto de alimentos con valor nutricional [96, 97], aumentan la percepción del estímulo más cercano e inducen la recompensa [98]

Cabe destacar que tal como hemos explicado el hipotálamo controla el metabolismo energético de los tejidos periféricos, por lo que es importante seguir investigando sobre los diferentes mecanismos por los que realiza esta función. En este sentido, se ha observado que, en diferentes núcleos del hipotálamo, entre ellos el LHA, se expresan receptores de dopamina. La señalización de la dopamina es una parte crucial del sistema de recompensa del cerebro y puede afectar al comportamiento alimentario.

La dopamina tiene la capacidad de modular el consumo de alimentos tanto por la vía de la recompensa (hedónica) como por la vía hipotalámica (homeostática) [99]. El aumento de la señalización dopaminérgica central se asocia a menudo con la estimulación de la alimentación, mientras que su disminución tiene el efecto contrario; sin embargo, en el hipotálamo, los efectos sobre la ingesta de alimentos dependen del área hipotalámica a la que se dirige [100, 101].

### **3.2. SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO**

El sistema dopaminérgico desempeña papeles importantes en la neuromodulación, como el control motor, la motivación, la recompensa, la función cognitiva, los comportamientos maternos y reproductivos. Las vías de señalización dopaminérgicas son cruciales para el mantenimiento de procesos fisiológicos y una actividad desequilibrada puede conducir a disfunciones relacionadas con distintas patologías [102].

La dopamina es un neurotransmisor sintetizado tanto en el SNC como en la periferia. Los receptores de dopamina se expresan ampliamente en el organismo (cerebro, riñón, glándulas suprarrenales, ganglios simpáticos, tracto gastrointestinal, vasos sanguíneos, corazón) y pueden actuar a través de diversos mecanismos de señalización que implican acoplamiento alternativo de proteína G o a través de mecanismos independientes de proteínas G, a través de interacciones con canales de iones o proteínas que están característicamente implicados en la desensibilización de receptores, como  $\beta$ -arrestinas [103].

Existen cinco tipos de receptores de dopamina: D1R, D2R, D3R, D4R y D5R [99, 104] implicados en las diferentes funciones desempeñados por el sistema dopaminérgico. La regulación de la ingesta es una de las funciones reguladas por la señalización de dopamina a través de D1R [105-107] y D2R [99, 104, 108, 109]. El aumento de la señalización dopaminérgica central a menudo se asocia con la estimulación de la alimentación, mientras que su disminución tiene el efecto contrario; sin embargo, en el hipotálamo, el efecto sobre la ingesta de alimentos depende de la zona hipotalámica implicada [100].

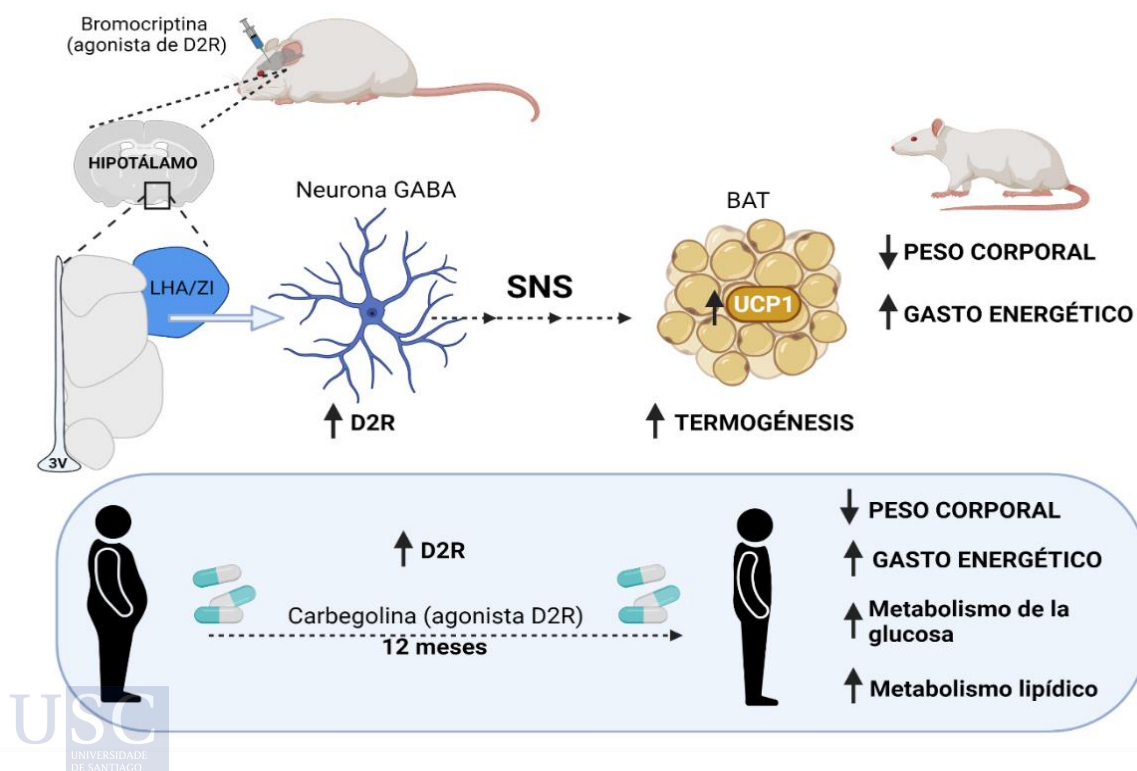
### **3.3. RECEPTOR DE DOPAMINA 2**

Uno de los receptores en el que nos centramos en la presente tesis doctoral es D2R. Estudios previos han descrito que el bloqueo crónico del D2R produce un incremento en la ingesta y en el peso corporal en ratas hembra y se ha visto que pacientes tratados con fármacos antipsicóticos bloqueantes del D2R presentan un incremento del apetito, ganancia de peso y desarrollo de DMT2 [110, 111]. También se ha reportado que individuos obesos e individuos con obesidad mórbida poseen niveles inferiores de D2R, así como de sus funciones [112]. Pero, sobre todo, tanto el D2R como sus agonistas, la bromocriptina (BC) y la cabergolina, presentan una gran relevancia clínica, ya que han sido ampliamente usados en el tratamiento de prolactinomas. En

concreto, desde el año 2009, la BC ha sido aprobada en Estados Unidos como terapia complementaria para la DMT2 [113]

Recientemente en otra investigación de nuestro grupo revelamos que la estimulación farmacológica o quimio-genética de las células que expresan el receptor de D2R en el LHA y la ZI disminuye el peso corporal y estimula la actividad del BAT en roedores de una manera independiente de la ingesta [101]. Más concretamente, estas acciones están mediadas por la estimulación del D2R en las neuronas GABAérgicas localizadas en el LHA y la ZI, lo que activa el sistema nervioso simpático (SNS) y, en última instancia, conduce al aumento de la actividad termogénica del BAT y el EE. Estos resultados proporcionan información sobre el lugar del cerebro y los mecanismos por los que la masa grasa disminuye en respuesta a la estimulación de la actividad del D2R del SNC, independientemente de las acciones anorexigénicas [101].

En consonancia con los hallazgos realizados en roedores, en estudios retrospectivos y prospectivos de pacientes con hiperprolactinemia, que fueron tratados con cabergolina (agonista dopaminérgico) se muestra una reducción del peso corporal y una mejora en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. La pérdida de peso se acompañó de una reducción de la grasa corporal total y de la adiposidad visceral. Es interesante el hecho de que el agonismo dopaminérgico logrado por el tratamiento con cabergolina en pacientes con hiperprolactinemia dio lugar a un aumento del EE, que está positivamente correlacionado con la pérdida de peso. Estos resultados pueden proporcionar una explicación mecanicista de cómo los agonistas D2R usados clínicamente actúan en el SNC para regular el equilibrio energético (Imagen 3) [101].



**Imagen 3. Efecto de agonistas de D2R en LHA/ZI sobre el EE.** Efecto de agonistas D2R en ratas y humanos sobre el peso corporal, termogénesis y el EE.

Fuente: elaboración propia con licencia de BioRender.

### 3.4. TRANSPORTE DE HORMONAS Y METABOLITOS AL HIPOTÁLAMO

La BHE proporciona una interfaz fisiológica entre el SNC y la circulación sistémica que permite la entrada de nutrientes y ciertas moléculas de señalización y restringe la entrada de microorganismos y partículas que pueden dañar el cerebro. Este límite permeable eficiente permite el mantenimiento de la homeostasis del SNC y la correcta función de los circuitos cerebrales. La BHE permite interacciones dinámicas entre los capilares sanguíneos y la red neuronal para proporcionar un control adecuado de las moléculas que se transporta. Aunque las características anatómicas de la BHE proporcionan una función protectora para el SNC contra las neurotoxinas transmitidas por la sangre, limita en extremo la eficacia terapéutica de los fármacos en el SNC, lo que dificulta enormemente el tratamiento de las principales enfermedades cerebrales [114].

La BHE está formada por la combinación de células endoteliales cerebrales no fenestradas que recubren las paredes de los vasos sanguíneos del SNC, que, junto con los pericitos, las neuronas y la glía constituyen la unidad neurovascular y confieren integridad a la BHE.

A nivel de la ME, la BHE está formada por capilares fenestrados que permiten un transporte más rápido de sustancias hacia los núcleos hipotalámicos sensibles a los nutrientes que se encuentran adyacentes. Además, en la ME también se encuentra un tipo de células especializadas de la glía, denominadas tanicitos, que forman una barrera física para controlar el transporte correcto de nutrientes y hormonas metabólicas al parénquima cerebral [115, 116].

Diversas señales de la periferia directamente relacionadas con la regulación de la homeostasis energética atraviesan la BHE a través de diferentes mecanismos. Así, la insulina sistémica atraviesa la BHE mediante un sistema saturable [117] y se concentra principalmente en el bulbo olfatorio y el hipotálamo [118]. De manera similar, la leptina llega al cerebro a través de un sistema saturable, que es independiente de la insulina y es altamente detectable en el plexo coroideo, la ME y el ARC [119].

Las células endoteliales de la BHE también cuentan con sistemas de transporte de glucosa [120]; ácidos grasos [121] y aminoácidos [122], y las variaciones en el estado energético del organismo, como en el ayuno/alimentación o enfermedades metabólicas, pueden afectar la función de tales sistemas de transporte [123].

Mientras que las señales metabólicas como la leptina y la ghrelina entran en el parénquima de la ME por difusión pasiva a través de los capilares fenestrados [124, 125] para llegar a las estructuras hipotalámicas más profundas, estas señales requieren un transporte activo por parte de los tanicitos [125, 126].

Los tanicitos forman la pared del tercer ventrículo y envían largas extensiones al parénquima para contactar con los vasos sanguíneos y las neuronas hipotalámicas. La forma y la ubicación de los tanicitos los sitúan en una posición ideal para conectar la periferia con los compartimentos nerviosos centrales. En este sentido, los tanicitos controlan el transporte de hormonas y metabolitos clave dentro y fuera del hipotálamo. Funcionan como sensores de la homeostasis periférica para las redes reguladoras centrales [127, 128].

En este contexto, durante los últimos años se ha logrado un importante avance en el conocimiento del transporte de distintas señales desde la periferia al SNC mediante la exploración del mecanismo involucrado en la regulación de los tanicitos. Los primeros datos obtenidos de estudios centrados en los tanicitos hipotalámicos han demostrado su papel en el transporte de sustancias entre el tercer ventrículo y la ME [129]. Además, se demostró que los tanicitos responden a la producción de hormonas y al suministro directo de hormonas a ciertos sitios anatómicos y a la circulación sistémica [130]. Curiosamente, los tanicitos responden rápidamente a la estimulación sistémica, lo que sugiere que este tipo de célula en particular podría desempeñar un papel en el control dinámico de la ME y la exposición de áreas

adyacentes a factores sistémicos [131]. Recientemente se ha avanzado en la comprensión de las funciones que desempeñan los tanicitos en la ME y el ARC [132, 133].

Estudios recientes han demostrado que, para responder a los constantes cambios en la disponibilidad de nutrientes y hormonas en la circulación, los tanicitos pueden modificarse debido a su notable plasticidad. Durante los ciclos fisiológicos de ayuno y alimentación, estas células sufren cambios tanto morfológicos como funcionales [132]. También en ciclos patológicos como la DIO, la cantidad de gotas de lípidos aumenta considerablemente en los tanicitos [134].

En la obesidad y en las condiciones metabólicas asociadas con el fenotipo obeso, las neuronas hipotalámicas se ven afectadas por una respuesta inflamatoria local que se desencadena en respuesta a los niveles excesivos de ácidos grasos en la dieta. Recientes evidencias sugieren que, al menos en parte, la actividad anómala de los tanicitos hipotalámicos puede desempeñar un papel en la actividad neuronal defectuosa en la obesidad y afecciones asociadas. Los estudios futuros deben centrarse en la identificación de los mecanismos que pueden proteger a los tanicitos de las anomalías inducidas por la dieta y el impacto de dicha protección en la progresión de las enfermedades metabólicas [127, 135, 136].

A pesar de la evidencia acumulada que muestra que los tanicitos cuentan con los componentes moleculares para participar en la detección y respuesta de nutrientes, no hay suficientes estudios funcionales que relacionen la detección de nutrientes por los tanicitos con las funciones hipotalámicas, ni que resalten la relevancia de este proceso en un contexto fisiológico y patológico [34, 137].

## **4. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR HORMONAS PERIFÉRICAS QUE ACTÚAN SOBRE EL SNC**

### **4.1. TEJIDO ADIPOSO**

El tejido adiposo fue considerado inicialmente, un tejido pasivo con la función exclusiva del almacenamiento energético, sin embargo, diversos estudios han demostrado que en realidad es un órgano endocrino dinámico que regula activamente el comportamiento y el metabolismo.

La generación y el mantenimiento del tejido adiposo son fundamentales para muchos procesos metabólicos y biológicos, como la regulación del apetito, la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina, la temperatura corporal y el equilibrio del peso corporal [138].

El tejido adiposo se encuentra en diversas localizaciones del cuerpo y comprende varios depósitos de grasa que pueden agruparse en subcutáneos (interescapulares o inguinales) y viscerales (rodean los órganos internos, como los depósitos retroperitoneales o gonadales) [138, 139]

Existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (WAT) y BAT. El WAT funciona como un depósito de energía clave para otros órganos, mientras que el BAT consume lípidos para la termogénesis adaptativa inducida por el frío. Los tejidos adiposos secretan varias hormonas, citoquinas y metabolitos (denominados adipoquinas) que controlan el equilibrio energético sistémico regulando las señales de apetito del SNC y la actividad metabólica de los tejidos periféricos [140].

En respuesta a los cambios en el estado nutricional o necesidades metabólicas, el tejido adiposo experimenta una remodelación dinámica, que incluye alteraciones cuantitativas y cualitativas en las células del tejido adiposo. La remodelación del tejido adiposo es un

mecanismo complejo, pero bien orquestado, modulado por múltiples tipos de células del tejido adiposo que permiten la adaptación a los cambios ambientales externos [140]. En este sentido, los adipocitos blancos pueden tener características termogénicas típicas de los adipocitos marrones mediante el *browning* (capacidad de transformar los adipocitos blancos en beige), y también los adipocitos marrones acumular más lípidos mediante el “blanqueamiento”. Además, se ha observado otras propiedades de remodelación como por ejemplo durante el embarazo y la lactancia en la que WAT se trans-diferencia en glándulas que segregan la leche, compuestas por células con abundantes lípidos citoplasmáticos (adipocitos rosados) y en el período de post-lactancia los adipocitos rosados se trans-diferencian de nuevo en WAT. También se han observado evidencias de liposecreción *in vitro* donde adipocitos maduros se trans-diferencian a células similares a los fibroblastos capaces de dar lugar a diferentes fenotipos [141].

Durante las últimas décadas, la investigación sobre tejido adiposo se ha incrementado en paralelo con la creciente incidencia de la obesidad. En este contexto, se ha hecho necesario el estudio en profundidad sobre el desarrollo y la biología de este tejido para poder explicar la patogénesis de la obesidad. Estudios recientes muestran que los factores ambientales durante las etapas prenatales y tempranas del desarrollo posnatal tienen la capacidad de programar la estructura y función del tejido adiposo, con implicaciones para el desarrollo de la obesidad [142]. A continuación, explicaremos las características del WAT y el BAT, así como la termogénesis y el *browning*.

#### 4.1.1. Tejido adiposo blanco

El WAT está compuesto por los adipocitos blancos, que son células uniloculares con una gran gota de lípidos y poco número de mitocondrias [143]. Aunque su desarrollo comienza prenatalmente, de forma bastante singular, tiene la capacidad de crecimiento ilimitado a lo largo de la edad adulta. Se distribuye en depósitos localizados en distintas zonas del cuerpo que presentan diferencias estructurales en cuanto a organización, tamaño celular y actividad biológica. En función de su localización se clasifica en diferentes tipos como el visceral, subcutáneo, perirrenal y perigonadal. Entre ellos destacan el visceral y el subcutáneo por su papel en el desarrollo de la obesidad [144]. Asimismo, la distribución del tejido adiposo presenta dimorfismo sexual [145, 146].

El WAT juega un papel importante en el mantenimiento del balance energético. Los triglicéridos (TG) pueden almacenarse en los adipocitos blancos durante la fase postprandial por la lipogénesis o la captación de lípidos, mientras que en situaciones de disminución del suministro de nutrientes o en estado de ayuno, los TG se movilizan por lipólisis [143, 147].

El WAT secreta hormonas implicadas en la regulación de la homeostasis energética denominadas adipoquinas, así como proteínas capaces de coordinar el sistema inmune conocidas como citoquinas. Ambas están implicadas en el desajuste metabólico característico de la obesidad. Estas señales tienen acción endocrina, paracrina y autocrina, actuando por tanto este tejido como un verdadero órgano endocrino [148-152]. La secreción de adipoquinas se encuentra regulada, entre otros factores, por el ayuno, la ingesta y la obesidad. Entre las adipoquinas secretadas por WAT encontramos la adiponectina, la resistina, irisina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y la más estudiada hasta el momento, la leptina.

En 1994 el grupo de Jeffrey Friedman identificó el gen de la leptina que codifica un compuesto de polipéptido de 16 kDa (167 aminoácidos), llamado leptina [153]. La principal fuente de leptina circulante son los adipocitos. La leptina está presente en suero a niveles directamente proporcionales a la cantidad de tejido adiposo [154, 155].

Se ha mostrado que la leptina presenta un efecto anoréxico, lo que la hace un factor de saciedad en la regulación de la homeostasis energética. Además, se ha demostrado que tiene

otros efectos, como la regulación de la homeostasis de glucosa, la regulación de la respuesta neuroendocrina a la inanición estimula la producción o supresión de otras hormonas y tiene un impacto en la actividad del SNS y la función reproductiva [156-161].

La vía de señalización de leptina comienza con la unión de leptina a su receptor, situado en órganos centrales y periféricos. Posteriormente, se describió el LEPR, expresado abundantemente en el SNC, principalmente en el hipotálamo. Los receptores de leptina se expresan en regiones cerebrales importantes para el equilibrio energético, como en prácticamente todos los núcleos hipotalámicos. [162].

La señalización hipotalámica de leptina desempeña un papel central en el mantenimiento de la homeostasis del peso corporal, ya que informa al cerebro del estado energético del cuerpo y media sus efectos catabólicos a través de la transducción de la señal en áreas hipotalámicas.

Alteraciones en la señalización y síntesis de la leptina se han relacionado con la obesidad y fallo en el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, la producción deficiente de leptina conduce a un fenotipo dramático de obesidad como el mostrado en ratones *ob/ob*. De la misma manera alteraciones en el receptor de la leptina dan lugar a fenotipo obeso en ratones *db/db*. En humanos, la deficiencia de leptina, aunque no es muy común, resulta en hiperfagia, obesidad grave y deterioro de la función inmune y retraso en la pubertad, que son tratados con reemplazamiento de leptina [47, 163-165].

Los casos más frecuentes de obesidad humana se caracterizan por un estado de resistencia a la leptina, en el cual, a pesar de presentar unos niveles elevados de leptina circulante, esta leptina no ejerce su acción anoréxica. Esta resistencia no se explica claramente, pero las hipótesis generales sugieren que puede deberse a varios mecanismos tales como el transporte reducido de leptina al cerebro consecuencia de una disminución de la expresión del receptor o señalización post-receptor deteriorada, señalización alterada de leptina en neuronas y circuitos hipotalámicos debido a la inactivación de la vía Janus quinasa -transductor de señal y activador de la transcripción (JAK-STAT), estrés del retículo endoplasmático, e inflamación, así como modificaciones epigenéticas [125, 166, 167].

#### **4.1.2. Tejido adiposo marrón**

El BAT está compuesto por adipocitos marrones, que son células adiposas multiloculares con un contenido variado de gotas de lípidos y poseen un elevado número de mitocondrias [168]. Este tipo de tejido es bien conocido por ser un órgano termorregulador clásicamente importante en pequeños roedores y humanos neonatos, sin embargo, se descubrió recientemente la importancia de este tejido a nivel metabólico también en humanos adultos. Así se ha visto que las regiones definidas de BAT funcionalmente activo están presentes en los seres humanos adultos, son más frecuentes en las mujeres que en los hombres, y se ha determinado que la cantidad de BAT está inversamente correlacionada con el IMC, especialmente en los adultos, lo que sugiere un papel potencial del BAT en el metabolismo humano adulto (Imagen4)[169, 170].

El BAT es un órgano especializado responsable de la termogénesis, un proceso necesario para mantener la temperatura corporal. El BAT está regulado por el SNS, que activa la lipólisis y el desacoplamiento mitocondrial en los adipocitos marrones [171]. La termogénesis sin escalofríos es el proceso por el que el BAT aumenta la temperatura mediante la producción de calor [168]. Este último proceso depende principalmente de la actividad de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) y de la actividad mitocondrial. Tanto la glándula suprarrenal como los nervios simpáticos producen norepinefrina (NE), un tipo de catecolamina que es capaz de estimular los receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos ( $\beta$ 3-ARs) que se encuentran predominantemente en los adipocitos [172]. La estimulación de los  $\beta$ 3-ARs conduce a la termogénesis en el BAT [168].

Además de la NE, la hormona tiroidea triyodotironina (T3) activa desempeña un papel importante en la regulación de la termogénesis del BAT [173]. La T3 activa regula la transcripción de UCP1 en los adipocitos marrones. Dado que el IMC se correlaciona de forma inversa con la actividad del BAT, la capacidad de este órgano de disipar energía en forma de calor se sugirió como un potencial terapéutico para tratar la obesidad [174]

La activación del BAT ocurre durante la aclimatación al frío e incluye la secreción de factores, conocidos como batoquinas, que se dirigen a varios tipos de células diferentes y promueven diferentes acciones como la adipogénesis, la angiogénesis, las interacciones de las células inmunitarias y el crecimiento de neuritas [175]. Estudios recientes también han proporcionado datos interesantes sobre la regulación metabólica de todo el cuerpo con un amplio espectro de mecanismos que involucran la comunicación entre el BAT y el hígado, el músculo esquelético y el intestino, así como con el SNC. Estas interacciones generalizadas podrían reflejar la propiedad de BAT de cambiar entre un estado termogénico activo donde la energía se consume y drena en gran medida de la circulación, y el estado pasivo termoneutral, donde el consumo de energía se apaga [176].

La capacidad protectora del BAT frente a la enfermedad metabólica crónica se ha atribuido tradicionalmente a su capacidad para utilizar glucosa y lípidos en la termogénesis. Sin embargo, su papel secretor de batoquinas, podría también contribuir a las consecuencias sistémicas. Se han identificado varias moléculas derivadas del BAT que actúan de manera paracrina o autocrina. Se cree que esta capacidad secretora de BAT está involucrada en los efectos beneficiosos del trasplante de BAT en roedores. Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), interleuquina 6 (IL6) y neuregulina 4 se encuentran entre los primeros factores endocrinos derivados del BAT que se han identificado [175].

En la presente tesis doctoral FGF21 es una hormona de gran interés, que está implicada en la regulación la homeostasis energética y se ha observado que en depósitos de tejido adiposo promueve la termogénesis y el *browning* [177-180], que los explicaremos más en detalle en el apartado 4.2. En los neonatos humanos, tanto el FGF21 como la UCP1 se expresan en la grasa visceral e interescapular, y sus niveles de expresión muestran una correlación positiva significativa, teniendo un papel importante en el *browning* [181]. FGF21 puede regular al alza la expresión de UCP1 y otros genes de termogénesis, regulando así el equilibrio entre la temperatura corporal y la energía [177-179]. También se ha descrito que FGF21 regula la interacción entre AMPK y sirtuina 1 (SIRT1), mecanismo esencial para que se produzca la termogénesis [180]. Explicaremos más sobre FGF21 en el apartado 4.3.

#### 4.2. TERMOGÉNESIS Y *BROWNING*

La termogénesis es la capacidad de disipar cantidades significativas de energía a través de la respiración no acoplada y la producción de calor, esta capacidad esta atribuida al BAT. La capacidad del BAT activa para gastar altas cantidades de energía ha aumentado el interés en estimular la termogénesis terapéuticamente para tratar enfermedades metabólicas relacionadas con la obesidad y la DMT2 [182].

El interés en la termogénesis del BAT y adipocitos beige tiene su origen en las observaciones clásicas de que sus mitocondrias poseen un mecanismo inusual para desacoplar la respiración de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP). La identificación de la proteína UCP1, la proteína responsable de este fenómeno ha mejorado enormemente nuestra comprensión de cómo estas células participan en la termogénesis [183-185], lo que ha estimulado el interés por dirigir las terapéuticamente para combatir la obesidad y mejorar el control glucémico [186-189].

La distinción de color entre un adipocito “marrón” y uno “blanco” refleja en gran medida la gran cantidad de mitocondrias en los adipocitos marrones en comparación con los adipocitos

blancos. Un adipocito marrón estimulado que genera calor de forma activa también contiene muchas gotas lipídicas pequeñas y se denomina multilocular, mientras que los adipocitos blancos, como los de los depósitos subcutáneos y viscerales, suelen tener una sola gota lipídica grande y unilocular. El hecho de tener muchas gotas lipídicas pequeñas aumenta la superficie de las gotas lipídicas y presumiblemente promueve el intercambio de metabolitos con las mitocondrias [190, 191]. Un adipocito marrón menos activo que no participa en la termogénesis (por ejemplo, después de la aclimatación a la termoneutralidad) adopta una morfología más similar a la de un adipocito blanco, aunque conserva una identidad celular epigenética que lo diferencia de un adipocito blanco [192].

Aunque el BAT ha sido considerado como el principal órgano termogénico responsable del mantenimiento de la temperatura corporal mediante la producción de calor, en los últimos años se ha caracterizado un nuevo tipo de grasa termogénica, la grasa beige, que también expresa la UCP1, y es un posible objetivo terapéutico en la obesidad y las enfermedades metabólicas [193, 194]. Los adipocitos beige se desarrollan a partir del WAT en respuesta a diferentes estímulos mediante un proceso conocido como *browning*. Los depósitos de WAT poseen la capacidad de adquirir características del BAT en respuesta a estímulos termogénicos (Imagen 4).

Diversos estudios sugieren que los adipocitos de tipo marrón positivos para UCP1 purificados de los depósitos BAT supraclaviculares humanos tienen un patrón de expresión genética similar al de los adipocitos beige murinos [195-201]. La primera teoría postula que los adipocitos beige se forman *de novo* tras la estimulación a partir de un conjunto de células precursoras [202]; la segunda sostiene que se interconectan a partir de los adipocitos existentes entre un estado inactivo y activo dependiendo de la presencia de estímulos [203, 204]. Una tercera posibilidad es que ambos mecanismos se produzcan, tal vez de forma dependiente del contexto y de muchos factores, como el tipo de estimulación, su duración, el depósito analizado y la proximidad a la entrada del SNS.

La promoción de la actividad del *browning* del WAT se asocia con una tolerancia in vivo al frío, un aumento del EE y protección contra la obesidad y la DMT2.

El coactivador 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (PGC1 $\alpha$ ) también participa en este mecanismo y activa la regulación transcripcional de la UCP1 [205]. PGC1 $\alpha$  es indispensable para la activación de los adipocitos marrones tras el estrés por frío o la estimulación con  $\beta$ -agonistas así como para el *browning* del WAT [168]. También proporciona a los adipocitos blancos algunas de las características del BAT, como la biogénesis mitocondrial y el desacoplamiento termogénico [143].

Dado que UCP1 en BAT y WAT ha evolucionado como un actor predominante en el control de la termogénesis adaptativa, la mayoría de los estudios sobre termogénesis se han centrado en las acciones en la termogénesis mediada por UCP1. Sin embargo, se ha observado la existencia de mecanismos termogénicos compensatorios, independientes de UCP1, lo que ofrece nuevas oportunidades para mejorar la obesidad y la DMT2, particularmente en grupos como las poblaciones de ancianos y obesos que no poseen adipocitos positivos para UCP1 [206] [207-209].

Estos estudios enfatizan la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos termogénicos (dependientes e independientes de UCP1) que gobiernan el EE en los adipocitos y sus posibles aplicaciones en la prevención de la obesidad humana y las enfermedades metabólicas [208, 210].

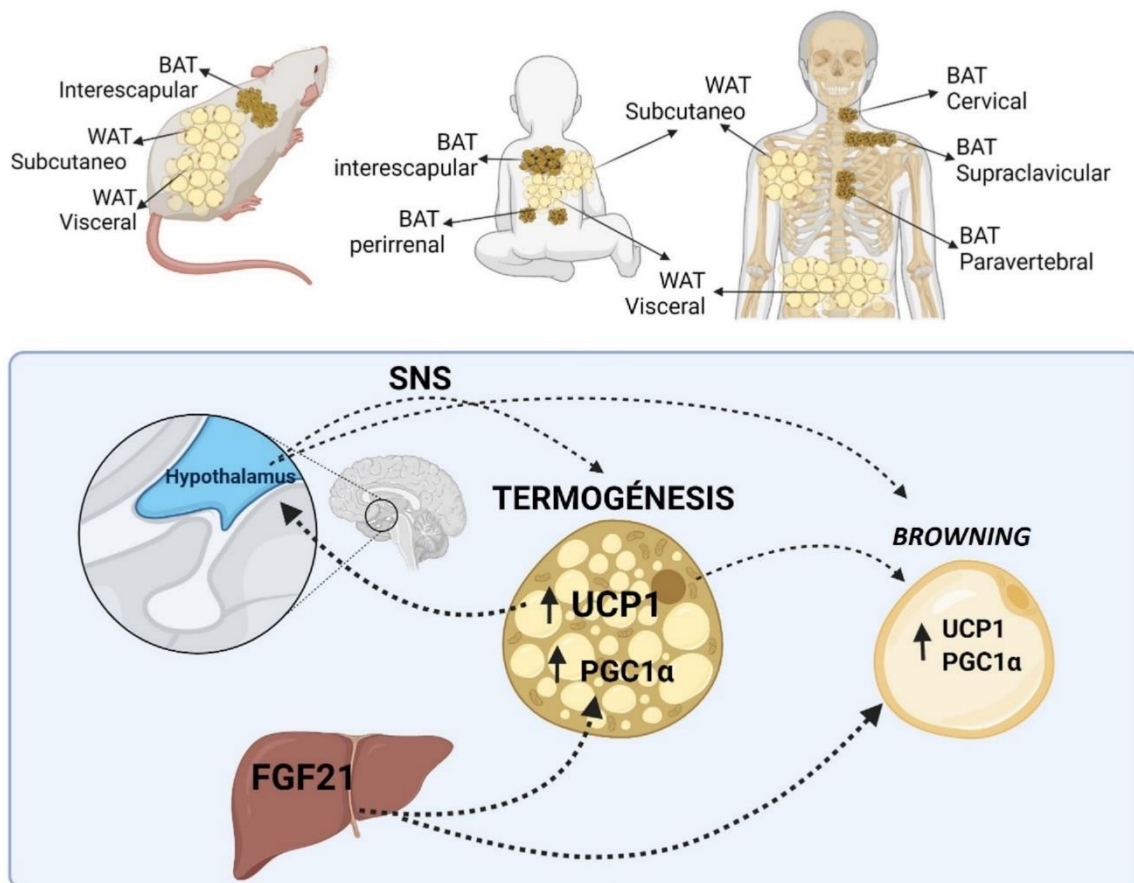


Imagen 4. Termogénesis y *browning*. Esquema de la termogénesis y *browning*, por acción del SNS. Fuente: elaboración propia con licencia de BioRender.

#### 4.3. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21

FGF21 es una hormona peptídica, miembro de la superfamilia FGF [179], que es sintetizada por varios órganos como en el páncreas, WAT, BAT, y fundamentalmente el hígado (Imagen 5) [211-215]. FGF21 señala a través de receptores de la superficie celular compuestos por los receptores clásicos del FGF (FGFR), que son tirosina quinasas, asociados en complejos con  $\beta$ -Klotho, una proteína transmembrana con 2 dominios de glicosidasa [216-218]. Los estudios *in vitro* indican que el FGF21 tiene mayor afinidad por el complejo receptor 1 de FGF21 (FGFR1)/ $\beta$ -Klotho que por otros isotipos del FGFR [216, 219]. Sin embargo, hay pruebas de que el FGF21 puede actuar a través de los 4 isotipos del FGFR. Mientras que los FGFR se expresan ampliamente,  $\beta$ -Klotho se expresa en un conjunto más selecto de tejidos que incluyen entre otros, el hígado, el WAT, el páncreas y los testículos [219, 220]. WAT y BAT y, en cierta medida, el hipotálamo, albergan un complejo binario de receptor transmembrana de FGFR1 y correceptor  $\beta$ -Klotho, y por ello se consideran los tejidos esenciales y dianas moleculares del FGF21 hepático o farmacológico [221].

La expectativa que causó la identificación de esta hormona se basa en los efectos metabólicos beneficiosos documentados de FGF21, que incluyen la pérdida de peso y adiposidad, incrementando el EE [222, 223], y mejorando desórdenes metabólicos como la hiperglicemia, la resistencia a insulina y leptina en modelos animales con obesidad y DMT2, inhibiendo la lipogénesis hepática y la producción de glucosa [179, 213-215, 222-225]. Por

todo ello, se ha propuesto a FGF21 como una nueva diana terapéutica para las complicaciones metabólicas como la DMT2 y la enfermedad del hígado graso [226, 227].

La biología de FGF21 es intrínsecamente complicada debido a sus diversas funciones metabólicas en múltiples órganos diana y su capacidad para actuar como factor autocrino, paracrino y endocrino [179, 226-228]. En la bibliografía se ha descrito que desde el nacimiento se eleva la expresión de FGF21 (que en fetos está disminuida) y que la lactancia materna provoca un incremento masivo de la concentración plasmática de FGF21, a lo que se asocian numerosos beneficios. Esto se explica más en profundidad en el apartado 5.1.5.

FGF21 interviene en múltiples aspectos del metabolismo a través de diversos mecanismos, en los que regula tanto la expresión y la actividad de las enzimas digestivas, como la síntesis y la liberación de varios factores hormonales intestinales [229, 230]. Se induce tras el ayuno tanto en roedores como en humanos [213-215].

En el hígado, FGF21 juega un papel importante en la regulación de la oxidación de ácidos grasos tanto en ayuno como en ratones que consumen una dieta cetogénica, dieta alta en grasa (HFD) y dieta baja en carbohidratos [214, 231]. FGF21 también regula el metabolismo de los ácidos grasos en ratones que consumen una dieta que promueve la lipotoxicidad hepática [226, 232]. Se ha demostrado que el FGF21 previene la esteatosis hepática tras la ingestión de leche cargada de lípidos [223].

Los ácidos grasos libres parecen ser los principales reguladores de la expresión del FGF21, actuando a través de la activación del gen de *fgf21* de manera dependiente del receptor activado por proliferador de peroxisomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) [233]. Recientemente se demostró que, bajo el control de PPAR $\alpha$ , los genes necesarios para el catabolismo de los lípidos se transcriben antes del nacimiento para que el hígado neonatal tenga una pronta capacidad de extraer energía de la leche al mamar. FGF21 permanece reprimido en el hígado fetal y se convierte en sensible a PPAR $\alpha$  después del nacimiento tras un cambio epigenético desencadenado por la inhibición de la histona desacetilasa 3 (HDAC3) [234].

Tal como lo explicamos en el apartado anterior, FGF21 promueve la termogénesis y el *browning* del WAT [177-180]. Además, en el WAT, FGF21 regula aspectos del metabolismo de la glucosa [224, 226]. La activación de la actividad termogénica se consideran los principales mecanismos subyacentes a los efectos de adelgazamiento del FGF21. Sin embargo, paradójicamente, la obesidad en roedores y humanos se caracteriza por niveles elevados de FGF21 en la sangre. Se ha propuesto cierto grado de resistencia a las acciones del FGF21 como parte de las alteraciones endocrinas en la obesidad. La resistencia en el tejido adiposo de roedores y pacientes obesos es probablemente atribuible a niveles anormalmente bajos del correceptor  $\beta$ -Klotho, necesario para la acción celular del FGF21.

Este péptido está muy expresado en el páncreas, implicado en la proliferación de las células- $\beta$  y donde parece desempeñar un papel antiinflamatorio en la pancreatitis experimental [226]. También tiene un papel antiinflamatorio en el músculo cardíaco. Aunque normalmente no se expresa en el músculo esquelético, el FGF21 se induce en situaciones de estrés muscular, especialmente en las miopatías mitocondriales [226].

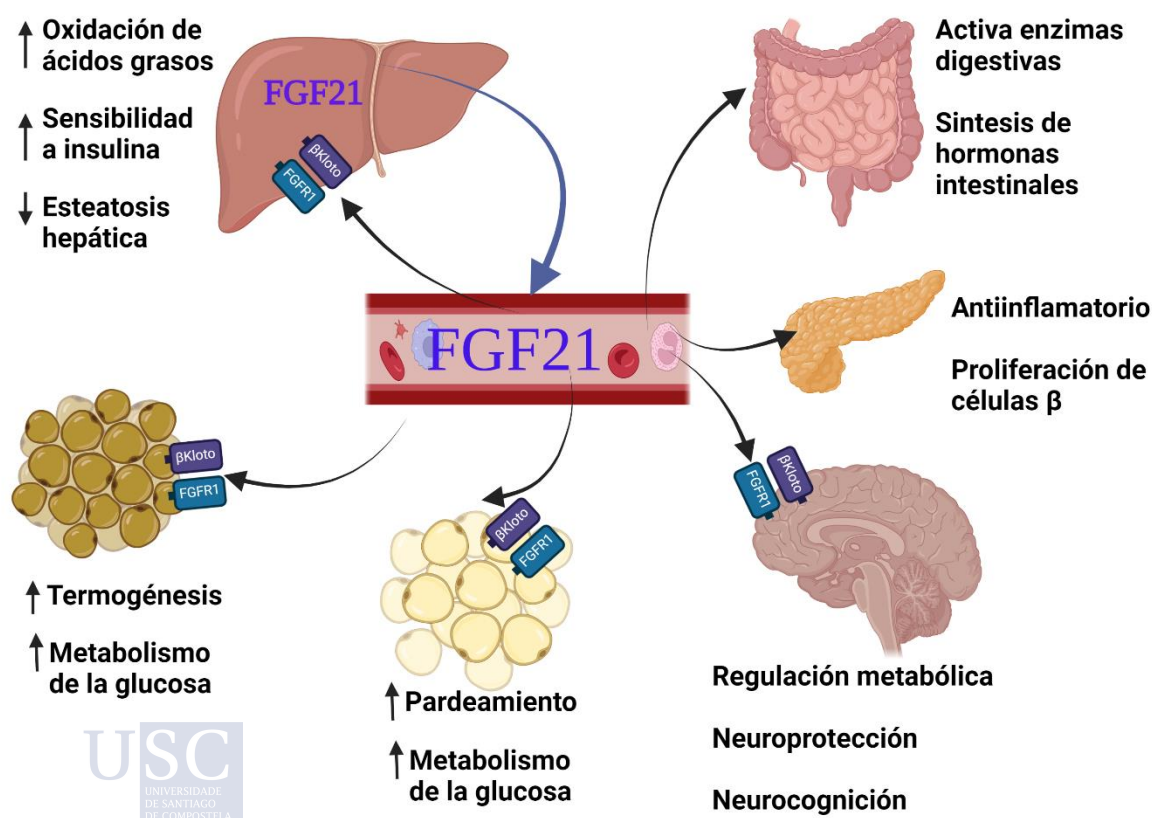
Además de los efectos descritos del FGF21 en roedores y modelos de primates no humanos de la DMT2 y la obesidad, los informes anteriores han demostrado que el FGF21 también desempeña un papel importante en el cerebro produciendo efectos en la regulación metabólica, la neuroprotección y la cognición [235]. FGF21 también presenta efectos antiapoptóticos y la recuperación de la función neurocognitiva [236].

Aunque se desconoce si el cerebro puede generar directamente FGF21, se ha demostrado que FGF21 puede moverse al cerebro a través de la BHE a través de la difusión simple [237] desempeñando un papel clave en la regulación metabólica, la neuroprotección y el papel

potencial de la cognición. FGF21 puede unirse a FGFR y  $\beta$ -Klotho expresados en el hipotálamo y otras regiones del cerebro, y actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y el eje hipotalámico-hipófisis-gonadal para regular los niveles de CRH y vasopresina [236].

Además, recientemente Geller y colaboradores observaron que los tanicitos producen y secretan FGF21 y están ubicados cerca de las neuronas sensibles a FGF21. El ayuno, probablemente a través del aumento de los ácidos grasos circulantes, regula esta producción central de FGF21. Los tanicitos almacenan palmitato y lo oxidan, lo que lleva a la activación de una vía de señalización de especies reactivas de oxígeno (ROS)/p38-MAPK, que es esencial para la expresión tancítica de FGF21 tras la exposición al palmitato. La delección de FGF21 tancítica desencadena un aumento de la lipólisis y los ratones deficientes para FGF21 en tanicitos exhiben un mayor EE y una reducción en la ganancia de masa grasa. Estos datos sugieren que los tanicitos detectan los ácidos grasos libres para mantener la homeostasis de los lípidos corporales a través de la señalización de FGF21 dentro del hipotálamo [238].

También es interesante el análisis de la maduración inmunitaria en los primeros años de vida. En este sentido, también se ha evaluado la influencia de algunos factores de crecimiento presentes en la leche materna, como FGF21, en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, proponiendo que tiene funciones moduladoras en las respuestas inmunitarias sistémicas en los primeros años de vida [239, 240]. Debido a todos estos efectos, el FGF21 se ha propuesto como una posible futura terapia para complicaciones metabólicas como la DMT2y la enfermedad del hígado graso [226, 241].



**Imagen 5. Funciones de FGF21 en órganos implicados en el metabolismo.** Esquema de las funciones de FGF21 sobre algunos órganos de interés metabólico. Fuente: elaboración propia con licencia de BioRender.

## 5. LACTANCIA MATERNA

La leche materna es el estándar normativo para la alimentación infantil y una fuente de nutrición óptima para lograr un crecimiento, desarrollo y salud adecuados del neonato. Debido a su naturaleza dinámica, la leche materna cambia su composición en el tiempo para satisfacer los requisitos nutricionales de los neonatos a medida que crecen. Además de su función nutricional, proporciona propiedades inmunológicas inmejorables y posee factores bioactivos que parecen estar involucrados en el desarrollo neurocognitivo del neonato, los procesos anti-oncogénicos, la comunicación celular y la diferenciación [242, 243]. Cabe destacar que las investigaciones de los últimos años ponen de manifiesto que los niños y niñas lactantes muestran un menor riesgo de ENT, como las enfermedades metabólicas (DMT2 y obesidad) en la vida adulta [244]. También se ha reconocido un papel fundamental en la comunicación entre la madre y el neonato [242, 245].

La OMS recomienda que los neonatos se alimenten a través de la lactancia materna de forma exclusiva hasta los 6 meses, siempre que sea posible, y como continuidad y complementariedad con la incorporación de alimentos, hasta los 2 años. Se ha observado que la lactancia materna puede prevenir la obesidad, y así se ha descrito en el estudio COSI 2015/2017, en el que participan 22 países europeos, y confirma el efecto beneficioso de la lactancia materna contra la obesidad, que aumentaba en gran medida si los niños no habían sido amamantados nunca o lo habían sido durante un período más corto [246].

Desde la OMS se han marcado como objetivo el “Plan de aplicación integral sobre nutrición materna, del lactante y del niño pequeño”. Este plan de acción ilustra una serie de acciones prioritarias que deben ser realizadas conjuntamente por los Estados Miembros y los asociados internacionales con el propósito de cumplir, de aquí a 2025, seis metas mundiales de nutrición, entre la que se incluye aumentar las tasas de lactancia materna exclusiva en los primeros seis meses de vida hasta un 50 % como mínimo [247].

### 5.1. LECHE MATERNA Y SU COMPOSICIÓN

La leche materna tiene una composición y características bioquímicas únicas en cada especie, especialmente en lo referido a calidad y cantidad de proteínas, carbohidratos (lactosa, oligosacáridos), lípidos (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y colesterol), componentes bioactivos (lactoferrina, lisozima, leucocitos, inmunoglobulinas, citoquinas, hormonas, oligosacáridos de la leche humana, microbioma, micro-ARN y células madre), hormonas, (adiponectina, leptina, ghrelina), factores de crecimiento, factores inmunológicos, probióticos, prebióticos y péptidos antimicrobianos con funciones endocrinas, metabólicas, inmunomoduladoras y antiinfecciosas [243].

El contenido energético de la leche materna es bastante estable durante el primer año de vida y es suficiente para satisfacer las necesidades energéticas de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna durante los primeros seis meses de vida, ya que se observa un crecimiento adecuado hasta los 6 meses [248-250]. Así se ha visto que la composición de la leche materna cambia con la edad gestacional y postnatal. Sin embargo, su composición puede ser susceptible a alteraciones determinadas por las condiciones patológicas que la madre puede enfrentar a lo largo del embarazo y el neonato en el período perinatal. Un estudio encontró que los factores perinatales están asociados con la composición de la leche materna desde la lactancia temprana hasta la tardía [251].

Las psicopatologías perinatales afectan a más del 25 % de las mujeres durante y después del período gestacional. Estos trastornos psiquiátricos pueden determinar potencialmente importantes variaciones biológicas en sus organismos, afectando a diferentes vías fisiológicas

y metabólicas. Es relevante que cualquiera de estos cambios que se produzcan en la madre puede alterar la composición normal de la leche materna, en particular la concentración de componentes nutricionales e inflamatorios, que desempeñan un papel en el funcionamiento y el desarrollo del cerebro del niño. De hecho, hay pruebas que los cambios en la composición de la leche pueden contribuir a las deficiencias cognitivas y a las alteraciones mentales en los niños [252]

La leche materna contiene una amplia gama de hormonas peptídicas que están involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo infantil. Estas hormonas esenciales podrían desempeñar un papel importante en la regulación de la reprogramación metabólica del recién nacido [253]. Un estudio reciente analizó las concentraciones de hormonas en la leche materna, observando que estas varían ampliamente entre las madres. Las concentraciones de hormona de la leche materna se asociaron con varias características maternas fijas y modificables [254]. Sin embargo, se necesitan más estudios para obtener más información sobre el papel específico de estos componentes bioactivos en las vías metabólicas relacionadas con la composición corporal. Esto podría ayudar a obtener una mayor comprensión del crecimiento de los bebés, tanto en entornos fisiológicos como patológicos [255, 256]. Por ello, en nuestro grupo nos interesamos por la hormona FGF21, que también fue detectada en leche materna tanto de humanos, como en modelos animales. A continuación, se resumen los principales efectos metabólicos que ejercen las hormonas presentes en la leche materna durante la etapa perinatal.

#### **5.1.1. Adiponectina**

La adiponectina es la hormona más abundante de la leche materna, siendo su concentración 20 veces superior a la concentración de leptina. Su presencia en este fluido se descubrió en el año 2006 [257-259]. Se relaciona la adiponectina de la leche materna con el menor peso corporal que tienen los niños amamantados en los primeros 6 meses de vida, sugiriendo que la adiponectina participa en la regulación temprana de la ganancia de peso perinatal [260]. Se ha observado que existe una correlación positiva entre los niveles de adiponectina en las madres, en la leche materna y en los niños amamantados. Esto indica que existe un nexo metabólico entre las madres y los lactantes a través de la leche materna [261]. Recientemente, se observó que los niños expuestos a elevadas concentraciones de adiponectina durante el periodo de lactancia materna presentan una ganancia de peso más lenta durante el primer año de vida [262, 263]. Sin embargo, existen también varios estudios que determinan que la adiponectina de la leche materna no se asoció significativamente con la composición corporal infantil [254, 264], y que la adiponectina transmitida por la leche está determinada por el estado metabólico materno y desempeña un papel regulador independiente en el crecimiento infantil temprano [265].

#### **5.1.2. Leptina**

La presencia de leptina en la leche materna se demostró en el año 1997 comprobándose que se transfiere a través de esta vía a la descendencia [266], mientras que en las leches de fórmula la presencia de leptina es controvertida, ya que el proceso de pasteurización reduce la cantidad de leptina detectable [267]. En estudios recientes se ha observado que los niños amamantados presentan niveles circulantes de leptina elevados respecto a los niños alimentados con fórmula, correlacionándose negativamente con la ganancia de peso en las primeras semanas de vida y con el IMC en la niñez [254, 268-271]. En este sentido, la leptina podría explicar, al menos parcialmente, el mayor riesgo de obesidad que presentan los niños alimentados con leches de fórmula con respecto a los niños amamantados [272-275]. Sin embargo, también hay estudios que no mostraron asociación entre la leptina y el crecimiento infantil en este momento

[264]. Se reconoce 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 [276]. Varios estudios en roedores han demostrado que la administración oral de leptina durante el periodo de lactancia previene la DIO y la resistencia a insulina a largo plazo, además de reducir la preferencia por dietas ricas en grasa [277-279].

### **5.1.3. Insulina**

Ya en 1983 se observó que la insulina estaba presente tanto en el calostro como en la leche propiamente dicha. En el calostro se encuentra a niveles supra-fisiológicos, mientras que en la leche su concentración es similar a los niveles circulantes existentes en un estado de ayuno [280, 281]. Los niveles circulantes de insulina varían en función del tipo de nutrición del lactante, siendo más elevados en los niños alimentados con leches de fórmula [282]. De acuerdo con las funciones biológicas de la insulina, cuanto mayor sea su concentración mayor es la acumulación de grasa en el tejido adiposo, lo que se traduce en un incremento tanto de la ganancia de peso como del riesgo de DM2 y obesidad en los niños que no son amamantados [283]. Sin embargo, hay controversia ya que hay estudios que no encuentran asociación, dependiendo de los meses a los que se realiza el estudio [284, 285]. Recientemente Chan y colaboradores en un estudio longitudinal observaron una asociación en forma de U entre la insulina de la leche materna y la composición corporal infantil con concentraciones intermedias que predicen menor peso-talla e IMC a los 4 y 12 meses por lo que especulan que las concentraciones intermedias de insulina de la leche materna pueden apoyar de manera óptima el metabolismo infantil, mientras que el páncreas inmaduro desarrolla su capacidad para producir insulina, mientras que la insulina insuficiente o excesiva en la leche materna puede afectar este proceso [254].

### **5.1.4. Ghrelina**

En el 2006 Aydin y colaboradores identificaron la ghrelina tanto en el calostro como en la leche materna, y observaron que los niveles de ghrelina de la leche se correlacionan positivamente con los niveles circulantes de dicha hormona en las madres. Esto llevó a pensar que, al igual que se observó en el caso de la leptina, la ghrelina podría pasar desde la sangre de la madre hacia la leche, aunque también existe la posibilidad de que se sintetice en las glándulas mamarias [286, 287]. La concentración de ghrelina en la leche va incrementando con la duración de la lactancia y se correlaciona con los niveles circulantes de esta hormona en los lactantes [288]. Además, se ha observado que los niños alimentados con leches de fórmula presentan niveles circulantes de ghrelina más elevados que los niños amamantados, y que las leches de fórmula tiene una mayor concentración de ghrelina que la leche materna [289].

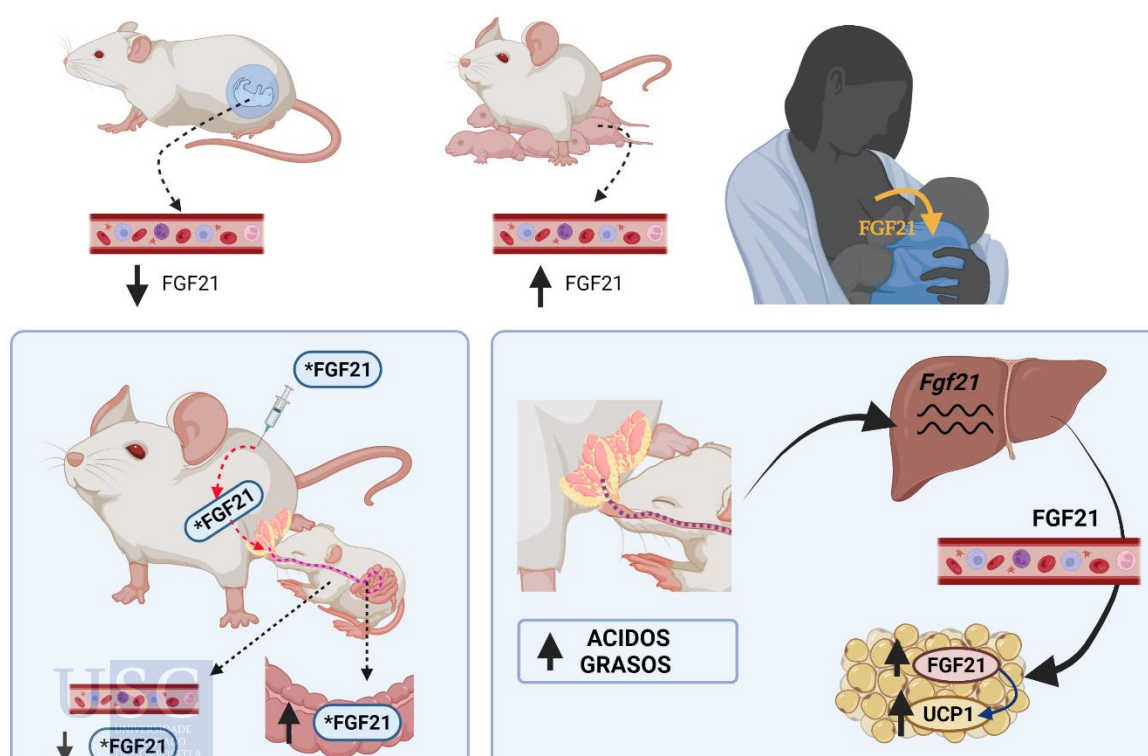
### **5.1.5. FGF21**

En los últimos años se han descubierto nuevos componentes presentes en la leche materna. Este es el caso de FGF21, cuya presencia se identificó en cantidades sustanciales en la leche, tanto en roedores como en humanos [229, 290]. En pacientes se observó que FGF21 está presente tanto en el calostro como en la leche madura, observándose un aumento significativo en la leche madura [290]

Se ha informado de una fuerte regulación de FGF21 en los neonatos de ratón, ya que los niveles de FGF21 son muy bajos en los fetos, pero los niveles sanguíneos de FGF21 aumentan drásticamente tras el nacimiento y el inicio de la lactancia; esto se asocia a la inducción de la expresión genética del FGF21 hepático en respuesta a los ácidos grasos contenidos en la leche [178]. También se ha descrito que la activación de FGF21 por la lactancia materna, resultante

de la secreción hepática, actúa directamente sobre el BAT produciendo la activación de la termogénesis [178, 229]. Asimismo, se ha evaluado la influencia del FGF21 procedente de la leche, en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, proponiendo que tiene funciones moduladoras en las respuestas inmunitarias sistémicas en los primeros años de vida [239, 240].

Recientemente se ha demostrado en ratones que el FGF21 procedente de la leche se transfiere al intestino neonatal, esto lo observaron en un estudio reciente utilizando FGF21 marcado radioactivamente ( $^{125}\text{I}$ -FGF21) administrado a las madres lactantes, el cual se acumula en la leche y se transfiere al intestino neonatal. Además, se demostró que la señalización adecuada de FGF21 al neonato es necesaria para garantizar una función digestiva y endocrina óptima del intestino en desarrollo [229]. Cabe destacar que se detectó la presencia de  $^{125}\text{I}$ -FGF21 en el contenido gástrico e intestinal de los ratones lactantes tras 36 h de ingesta de leche de madres tratadas con  $^{125}\text{I}$ -FGF21. Por el contrario, los niveles de  $^{125}\text{I}$ -FGF21 en el suero de los neonatos fueron muy bajos (menos del 5 % de los valores del estómago), lo que indica que el FGF21 de la leche se retiene principalmente en el estómago y el intestino del neonato, y no se transfiere de forma significativa a la circulación sistémica. Por lo que sugieren que el FGF21 materno no contribuye a la reserva circulante de FGF21 en el neonato y, si tiene un efecto biológico, es probable que se produzca localmente en el intestino (Imagen 6) [229]. Además, recientemente se demostró que, bajo el control de PPAR $\alpha$ , los genes necesarios para el catabolismo de los lípidos se transcriben antes del nacimiento para que el hígado neonatal tenga una pronta capacidad de extraer energía de la leche. FGF21 permanece reprimido en el hígado fetal y se convierten en sensible a PPAR $\alpha$  después del nacimiento tras un cambio epigenético desencadenado por la inhibición de HDAC3 mediada por el  $\beta$ -hidroxibutirato [234].



**Imagen 6. FGF21 en la leche materna.** Esquema de la producción de FGF21 en fetos y neonatos lactantes. Transferencia de FGF21 marcado radioactivamente ( $^{125}\text{I}$ -FGF21) de madres lactantes a crías, en las que se observan niveles más elevados en intestino, a comparación de los niveles sanguíneos. Síntesis de FGF21 hepático estimulado por los elevados niveles de ácidos grasos procedentes de la leche materna. Fuente: elaboración propia con licencia de BioRender.

## 5.2. INFLUENCIA DE LA LACTANCIA MATERNA Y LA INTRODUCCIÓN DE ALIMENTOS EN LA OBESIDAD

Ya en 1981 Kramer observó la primera evidencia de que la lactancia materna podría reducir el riesgo de sobrepeso y obesidad [291]. Desde entonces se publicaron múltiples estudios observacionales que investigan la relación entre la lactancia materna y el riesgo de obesidad a largo plazo, obteniéndose resultados contradictorios [292]. En el año 1962 McCance demostró que las alteraciones en la nutrición perinatal tienen consecuencias a largo plazo sobre la adiposidad [293], lo que sugiere que la nutrición actúa durante periodos críticos perinatales programando a largo plazo la composición corporal del organismo, por lo que se ha propuesto que la lactancia materna ejerce un papel protector frente al desarrollo de obesidad en la edad adulta, ya que se ha observado que la lactancia materna se asocia con un menor riesgo de adiposidad a largo plazo [291, 294-296].

El crecimiento del niño y el riesgo de sobrepeso están determinados por el patrón de alimentación de los primeros meses de vida [297]. Arenz y colaboradores publicaron un estudio clave que abrió el camino a posteriores investigaciones sobre el efecto de la lactancia materna en la prevención de la obesidad infantil [294], ya que la lactancia materna reduce el riesgo de obesidad infantil en relación directa a su duración [298-304].

El aumento de peso excesivo o rápido durante los primeros 2 años de vida se asocia con un mayor riesgo de sobrepeso y obesidad en la infancia y en adultos. En comparación con los bebés amamantados, los bebés alimentados con fórmula tienen más probabilidades de experimentar un aumento de peso excesivo o rápido, y este mayor riesgo en las poblaciones de bebés alimentados con fórmula puede deberse a una serie de mecanismos diferentes. Estos mecanismos incluyen la composición de nutrientes y de la fórmula y la forma en que se prepara y proporciona la fórmula a los bebés [305, 306]. Por otra parte, también se ha publicado que tanto la alimentación con fórmula como la alimentación complementaria precoz provocan un aumento de peso en los primeros meses de vida, suponiendo un riesgo de sobrealimentación, lo que conlleva un aumento de la adiposidad y riesgo de enfermedades cardiovasculares [305, 307-310].

Aunque estos datos tienen un impacto importante, existen autores que no han encontrado ninguna relación entre la lactancia materna y el menor riesgo de sobrepeso y obesidad. Esto puede deberse a la existencia de otros factores genéticos y ambientales (peso al nacimiento, aumento del peso gestacional, diabetes gestacional, tabaquismo materno y obesidad de los padres) que actúan *per se* como factores de riesgo de la obesidad [311-316].

## 5.3. INFLUENCIA DEL PESO DE LA MADRE EN LA OBESIDAD DE LA DESCENDENCIA

La obesidad materna y el aumento excesivo de peso gestacional constituyen los factores de riesgo obstétricos más comunes y tienen implicaciones directas no solo en términos de resultados de morbilidad y mortalidad perinatal y materna [317-319], sino también desde una perspectiva de salud pública a más largo plazo a través de un mayor riesgo de obesidad en la próxima generación [320].

Los estudios de cohorte madre-hijo han establecido que tanto el IMC antes del embarazo como el aumento de peso gestacional se asocian de forma independiente con factores de riesgo metabólicos en la descendencia adulta, con un mayor riesgo de sobrepeso y obesidad [321, 322]. Si bien estas asociaciones entre la obesidad materna y la salud infantil pueden deberse a rasgos obesogénicos genéticos compartidos, que influyen en el peso corporal, las líneas convergentes de evidencia sugieren que la susceptibilidad a la obesidad se programa en parte en el feto o neonato en desarrollo a través de la exposición a factores metabólicos adversos durante los períodos críticos de desarrollo en la vida temprana [323, 324].

En roedores la alimentación materna con HFD durante la lactancia modifica la composición de la leche materna y predispone a la descendencia a la obesidad y al deterioro de la homeostasis de la glucosa en la edad adulta [325, 326]. Esta disfunción metabólica se ha asociado con un deterioro de la función del WAT [326, 327], una inhibición de la actividad termogénica del BAT [325] y circuitos hipotalámicos dañados [328].

El efecto de las alteraciones nutricionales de la madre durante el periodo de lactancia sobre la programación de la obesidad en la descendencia ha sido ampliamente estudiado. Por el contrario, aunque los estudios en animales han sugerido que la sobrealimentación neonatal es un parámetro crítico que influye en los resultados metabólicos a largo plazo [329-331], los estudios relativos a la influencia de la alimentación o la lactancia de las propias crías en la reprogramación a largo plazo del equilibrio energético no han sido concluyentes hasta ahora.

# HIPÓTESIS



## HIPÓTESIS

Por todo esto en la presente tesis nos planteamos que la prolongación del periodo de lactancia previene los efectos nocivos que produce la dieta alta en grasa en la edad adulta. Este efecto se produce a través de la modificación de determinados mecanismos fisiológicos que implican la interacción de órganos periféricos con el sistema nervioso central, y que son los responsables de contrarrestar los efectos adversos sobre el peso corporal y la adiposidad.



# OBJETIVOS



## OBJETIVOS

- Estudiar el papel de FGF21 sobre el mecanismo implicado en el efecto protector de la lactancia prolongada frente a la obesidad inducida por dieta y sus comorbilidades asociadas en edades adultas.
- Evaluar el efecto de la lactancia prolongada a nivel central, especialmente sobre el sistema dopaminérgico del hipotálamo.
- Estudiar la posible interacción entre FGF21 y el sistema dopaminérgico para mediar los efectos beneficiosos de la lactancia materna.
- Estudiar la posible implicación de los tanicitos de la ME mediando el transporte de FGF21 desde el hígado al hipotálamo.



# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la realización de esta tesis han sido revisados y aprobados previamente por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA), Campus de Santiago de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo el procedimiento 15010/17/007 del Prof. Rubén Nogueiras Pozo, bajo su supervisión y la de la Dra. Luisa María Seoane Camino, de acuerdo con la normativa europea y española para el uso de animales de experimentación animal. Estos procedimientos se han realizado bajo el amparo del marco legislativo vigente: 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; Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Los certificados de capacitación (según el orden ECC/566/2015) de la autora de la tesis son b381 y c421, expedido por la Consellería do Medio Ambiente - Xunta de Galicia.

De acuerdo con las consideraciones éticas asociadas al uso de animales de experimentación, los diseños experimentales de esta tesis doctoral se realizaron siguiendo el principio de las tres R: reemplazo, reducción y refinamiento. Se realizó los procedimientos con el mínimo número posible de animales que permitiese alcanzar los objetivos, teniendo mayores probabilidades de producir resultados satisfactorios. Además, la experiencia adquirida permitió refinar los procedimientos experimentales con el fin de eliminar o reducir al máximo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero. Sin embargo, dada la perspectiva fisiológica de esta tesis se limitó seriamente la posibilidad de reemplazar el uso de animales, ya que la homeostasis energética implica la comunicación de los tejidos periféricos (hígado, tracto gastrointestinal, tejido adiposo, etc.) con el SNC a través de señales que llegan al cerebro por el torrente sanguíneo. La metodología empleada permitió la recolección de múltiples muestras de tejidos y la realización de distintos análisis sobre los mismos animales siempre que fuera posible.

Todos los animales fueron estabulados en el momento de su llegada y tuvieron un período de aclimatación de 5-7 d antes de comenzar los experimentos. Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones del Animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la USC, con número de registro REGA: ES150780263401, y posteriormente en el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), con número de registro REGA: ES150780292901. Se mantuvieron en condiciones controladas de humedad, temperatura ( $21 \pm 2$  °C) y ciclos alternos de luz (12 h luz/ 12 h oscuridad). Durante este tiempo tuvieron libre acceso a agua y comida, las dietas se especificarán posteriormente en cada diseño experimental, teniendo dieta control (CD) y HFD (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los tipos de dietas

	Tipo de dieta	
	Control (CD)	Alta en grasa (HFD)
Energía (kcal/g)	3,85	4,73
Materia grasa	10 %	45 %
Proteínas	20 %	20 %
Carbohidratos	70 %	35 %



Todos los reactivos (Tabla 10), material y equipos (Tabla 11), programas informáticos (Tabla 12) y anticuerpos (Tabla 13) utilizados en los experimentos de la tesis serán referenciados a lo largo del texto y toda la información del producto y del proveedor se especificará en el apartado 9.

Se llevó a cabo el seguimiento controlado de todos los animales mediante la monitorización periódica de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto aspecto físico y la adaptación al manejo por el personal del laboratorio, tratando así de minimizar el posible estrés generado durante el desarrollo de los procedimientos experimentales. La estabulación de los animales fue colectiva (3-4 animales por jaula, siguiendo la normativa Real Decreto 53/2013), debido al comportamiento y necesidades sociales de estos animales, excepto en los procedimientos que por el bienestar del animal o necesidades del experimento se requiera la estabulación individual. En este último caso, los animales no se estabularon individualmente periodos superiores a 10 días.

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron los siguientes modelos animales:

- Rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela y posteriormente del área de cría del CEBEGA.
- Ratón de tipo salvaje (C57BL/6J) procedentes del área de cría del CEBEGA.
- Ratón D2R-cre (C57BL/6J) procedentes de cría propia en el área de experimentación del CEBEGA.
- Ratón Vgat-cre (C57BL/6J) procedentes de cría propia en el área de experimentación del CEBEGA.
- Ratón AlbCre-FGF21 (C57BL/6J KO FGF21) generados y cedidos por la Dra. Guadalupe Sabio del grupo “Papel de las quinasas activadas por el estrés en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer” del CNIC (Centro Nacional de investigaciones Cardiovasculares).

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

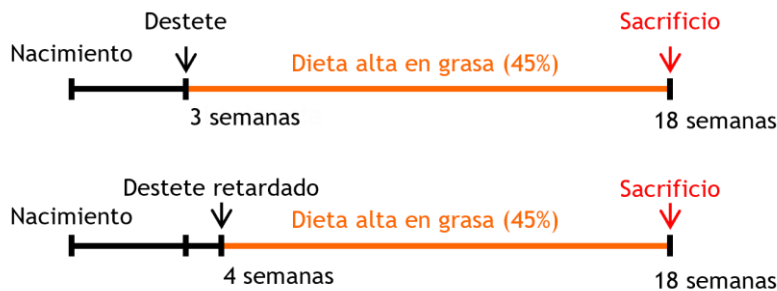
### 2.1. MODELO DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA

Se utilizó la rata común (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley. Se realizó el cruce de macho y hembra de 3 meses de edad para la obtención de camadas, que fueron normalizadas a 12-16 crías (hembras y machos).

El modelo de lactancia prolongada (DW) se desarrolló extendiendo el período de las crías junto con sus madres de 21 d a 28 d, es decir, un destete a las 4 semanas de edad, mientras que los controles, grupo de lactancia estándar (SW), se destetaron a las 3 semanas de edad. Después del destete, sólo los machos fueron utilizados para los experimentos de la presente tesis. Tanto las ratas DW como las SW tras el destete fueron alimentados con dieta HFD, hasta que fueron adultas.

Se realizó un seguimiento semanal de peso e ingesta hasta la realización de los diferentes procedimientos en edad adulta, entre los que se encuentran la prueba de frío, fenotipado metabólico en termoneutralidad, y demás procedimientos descritos en los siguientes apartados. En resumen, los grupos experimentales fueron:

- SW-HFD: ratas con lactancia estándar alimentadas con HFD
- DW-HFD: ratas con lactancia prolongada alimentadas con HFD

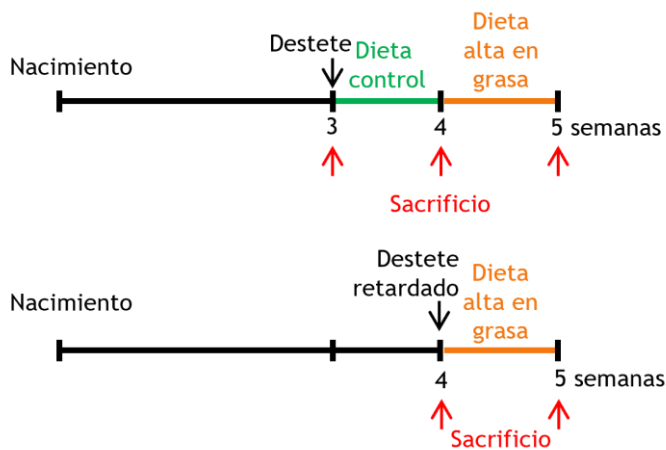


## 2.2. MODIFICACIÓN DE LA DIETA RATAS CON LACTANCIA ESTÁNDAR

Con el fin de determinar si los efectos observados en el modelo son producidos por la DW, o por la semana extra de HFD que tienen las ratas de SW, decidimos realizar un grupo de ratas que fueron destetadas a tres semanas de edad, posteriormente fueron alimentadas con CD, ya que el grupo de DW mientras continúa con la madre en la camada está alimentándose de leche materna y CD. A continuación, cuando las SW tienen 4 semanas de edad, y las DW también son destetadas a la misma edad, comenzamos a alimentar a las ratas con HFD simultáneamente. Se realizó un seguimiento de peso corporal e ingesta, resonancia magnética y fotografías térmicas. Se sacrificaron a distintas edades, en base a lo que tenemos los siguientes grupos experimentales:

- SW (3 semanas de edad)
- SW + 1 semana de CD (4 semanas de edad)
- SW+ 1 semana de CD + 1 semana de HFD (5 semanas de edad)
- DW (4 semanas de edad)
- DW + 1 semana de HFD (5 semanas de edad)

Además, también pesamos a las madres, tanto de SW (3 semanas) como de DW (4 semanas) y obtuvimos leche materna y sangre, para la obtención de plasma.



## 2.3. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE FGF21 EN EL HÍGADO DEL MODELO DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA

Con el fin de determinar si el aumento de la producción hepática de FGF21, demostrado anteriormente por el grupo en este modelo animal, estaba relacionada con los efectos de DW, se realizó la inhibición de la expresión génica de FGF21 a nivel hepático. Partimos del modelo de DW, alimentadas con HFD, es decir los grupos SW-HFD y DW-HFD, que cuando fueron adultas se administró el lentivirus que produjo la inhibición de la expresión génica de FGF21 en el hígado. Las ratas fueron inyectadas con 500  $\mu$ L de vectores lentivirales diluidos en

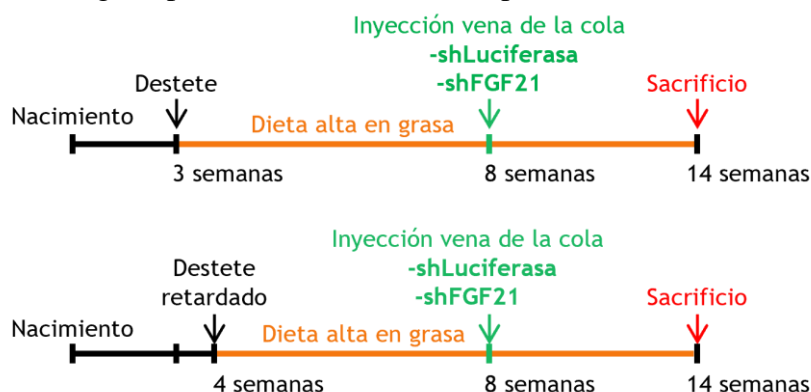
solución salina. Para la regulación descendente de FGF21 específicamente en el hígado, utilizamos vectores lectivirales de ácido ribonucleico de cadena corta (shRNA) FGF21 ( $1 \times 10^9$  PFU/mL), mientras que para los controles utilizamos shLuciferasa.

Los virus fueron generados en el laboratorio del Dr. Miguel Fidalgo (Stem Cells & Human Diseases laboratory, CIMUS, Santiago de Compostela-España). Los shRNAs específicos para la eliminación de transcripciones de FGF21 en shRNA de rata y shLuciferasa fueron diseñados, sintetizados y subclonados en plásmido lentiviral pLKO.1. Todas las construcciones shRNA fueron confirmadas por la secuenciación de Sanger y la eficiencia de derribo fue validada por qPCR. Las secuencias de destino de los shRNAs utilizados fueron: sh-Luciferasa: CCTAAGGTAAAGTCGCCCTCG; sh-FGF21: TCTCTATGGATCGCCTCACTT. Por tanto, los grupos experimentales son:

- SW-HFD + shLuciferasa
- DW-HFD + shLuciferasa
- DW-HFD + shFGF21

Tras la administración, día 0, realizamos un seguimiento de peso e ingesta semanalmente hasta llegar a la semana 7, momento en el que se produjo el pico de mayor efectividad. Se realizó el análisis de la composición corporal, temperatura interescapular y corporal, y su posterior sacrificio. Durante todo el procedimiento fueron estabuladas grupalmente, y con libre acceso a agua y comida.

Partiendo de los tejidos obtenidos tras el sacrificio, en esta tesis analizamos la expresión del D2R en el LHA/ZI, mediante la técnica del western blot, para determinar si la inhibición de FGF21 en hígado producía cambios en la expresión del D2R.



#### 2.4. ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE FGF21 EN RATAS ESTÁNDAR

Para corroborar que FGF21 actúa a nivel central regulando la vía hipotalámica dopaminérgica, realizamos la administración aguda de FGF21 en el cerebro. Previamente a esta tesis, en nuestro grupo se realizó una prueba de dosis de FGF21 intracerebroventricular (ICV) en ratas macho adultas, alimentadas con CD, en las que administramos dos dosis de FGF21 humano (Tabla 10 Ref. 1). En esta prueba observamos que tanto en la dosis más baja ( $0,4 \mu\text{g}/\text{rata}$ ), como en la más alta ( $4 \mu\text{g}/\text{rata}$ ), se obtuvieron los mismos resultados: menor ganancia de peso, sin cambios en ingesta y mayor termogénesis que los controles (ICV salino). Por lo que, en esta tesis continuamos con la dosis más baja ( $0,4 \mu\text{g}/\text{rata}$ ) para realizar los diferentes procedimientos.

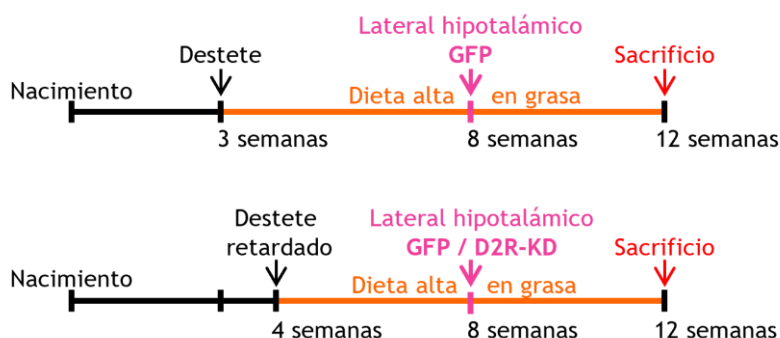
Cuatro días antes las ratas fueron canuladas, tras la administración ICV salino o FGF21 las ratas fueron sacrificadas a los siguientes tiempos tras la administración: 2, 4, 8, 24 h. Antes de la administración de FGF21 se pesaron las ratas, la dieta y se realizaron fotos termográficas, y de la misma manera antes del sacrificio de cada uno de los grupos.



## 2.5. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE D2R EN EL LHA/ZI DEL MODELO DE LACTANCIA PROLONGADA

Para determinar si la DW actúa a nivel central sobre el sistema dopaminérgico, la expresión del receptor de dopamina 2 (D2R) se silenció inyectando un adenovirus asociado que codificaba un shRNA contra D2R (shD2R) o una secuencia codificada de GFP en el LHA/ZI de las ratas del modelo de DW, alimentadas con HFD. Se administró estereotáxicamente y de forma bilateral en el LHA/ZI, 1  $\mu$ L de vector adenoviral ( $3,5 \times 10^{13}$  PFU/mL) o vector control ( $3,5 \times 10^{10}$  PFU/mL). Al ser un adenovirus asociado, la inhibición no aparece hasta 3 semanas después de la infección, pero el efecto es permanente. El vector control lleva GFP que nos servirá de control para comprobar la eficacia de la administración. Después de la administración las ratas fueron estabuladas grupalmente y se realizó un seguimiento del peso y la ingesta, 3 veces por semana, hasta su sacrificio. Por tanto, los grupos experimentales son:

- SW-HFD + GFP
- SW-HFD + shD2R
- DW-HFD + GFP
- DW-HFD + shD2R



## 2.6. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DEL D2R EN EL LHA/ZI DE RATAS CON DIETA CONTROL TRATADAS CON FGF21 ICV

Con el fin de investigar si la expresión D2R es inducida por FGF21, y por tanto era necesaria para las acciones biológicas de FGF21, administramos el adenovirus asociado que codifica el D2R- *Knockdown* (D2R-KD) estereotáxicamente en el LHA/ZI de ratas con CD, a las que posteriormente les administramos FGF21 (Tabla 10 Ref. 1) ICV. Para ello administramos el D2R-KD o GFP, igual que el procedimiento anterior (Apartado 2.5), y realizamos el seguimiento de peso e ingesta durante tres semanas. Una vez transcurridas las tres semanas después de la administración de los vectores virales se implantaron cánulas ICV para la administración aguda de FGF21. Después esta segunda operación los animales se estabularon de forma individual y tras 4 d de recuperación administramos ICV el FGF21, tal como lo habíamos hecho previamente (Apartado 2.4), sacrificando las ratas a las 8 h de la administración de FGF21. Por tanto, los grupos experimentales son:

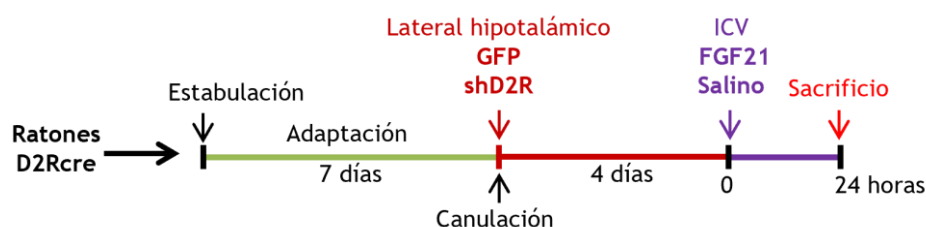
- GFP + salino
- GFP + FGF21 ICV
- D2R-KD + salino
- D2R-KD + FGF21 ICV



## 2.7. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE D2R EN EL LHA/ZI DE RATONES D2R-CRE DEPENDIENTE TRATADOS CON FGF21 ICV

Con el fin de confirmar el requisito de D2R en LHA/ZI para la acción de FGF21 utilizamos un modelo de ratón transgénico D2R-Cre (C57BL/6J, peso 20-25 g, edad 8-10 semanas), en el que los ratones D2R-Cre fueron inyectados en el LHA/ZI con un adenovirus dependiente de Cre que codifica un ARN control *scrambled* (Ad-hSyn-DIO-EGFP) o un shRNA contra D2R (Ad-hSyn-DIO-shD2R-EGFP). Estos adenovirus hacen efecto a los 5 d, por lo que ya en la misma intervención quirúrgica colocamos la cánula, para la posterior administración aguda de FGF21 (Tabla 10 Ref. 1) ICV en el cuarto día, de tal manera que el día 5 tendremos el efecto del virus y el de FGF21, en este día los animales fueron sacrificados. Los ratones fueron estabulados con libre acceso a CD y agua. Por tanto, los grupos experimentales son:

- Ratones D2R-cre GFP + salino
- Ratones D2R-cre GFP + FGF21 ICV
- Ratones D2R-cre shD2R + salino
- Ratones D2R-cre shD2R + FGF21 ICV



## 2.8. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE FGFR1 EN EL LHA/ZI EN RATONES D2RCRE TRATADOS CON FGF21 ICV

Para evaluar si FGF21 actúa directamente sobre las neuronas D2R de LHA/ZI, decidimos silenciar FGFR1. Para ello realizamos el silenciamiento selectivamente en neuronas D2R de LHA/ZI mediante la administración estereotáxica de pAAV-SYN-DIO-EGFP para el grupo control o AAV8- SYN-shFGFR1 para el grupo con el silenciamiento de FGFR1, en el LHA/ZI de ratones D2R-Cre (C57BL/6J, peso 20-25 g, edad 8-10 semanas). Estos adenovirus asociados tienen una efectividad de 3 semanas, tras las cuales realizamos la intervención quirúrgica para colocar la cánula, para la posterior administración aguda de FGF21, tal como describimos anteriormente. Los ratones fueron estabulados con libre acceso a CD y agua. Los ratones fueron sacrificados a las 8 h desde la administración de FGF21 (Tabla 10 Ref. 1) o salino ICV. Por tanto, los grupos experimentales son:

- Ratones D2R-cre GFP + salino
- Ratones D2R-cre GFP + FGF21 ICV
- Ratones D2R-cre shFGFR1 + salino
- Ratones D2R-cre shFGFR1 + FGF21 ICV



### 2.9. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DEL D2R EN EL LHA/ZI DE RATONES VGAT-CRE TRATADOS CON FGF21 ICV

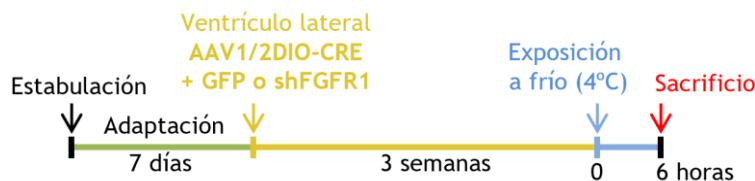
Para entender si las neuronas GABAérgicas de LHA/ZI podrían ser realmente los efectores de las acciones metabólicas de FGF21, delecionamos D2R específicamente en neuronas GABAérgicas LHA/ZI mediante la administración de Ad-hSyn-DIO-EGFP (controles) o Ad-hSyn-DIO-shD2R-EGFP en la LHA/ZI de un modelo de ratón transgénico Vgat-cre (C57BL/6J, peso 20-25 g, edad 8-10 semanas de edad). Estos adenovirus tienen una efectividad de 5 d, por lo que en la misma intervención quirúrgica colocamos la cánula, para la posterior administración aguda de FGF21 (Tabla 10 Ref. 1) o salino ICV en el día 4. Los ratones fueron estabulados con libre acceso a CD y agua. En el día 5, en el que tuvimos el efecto del virus junto con FGF21 los ratones fueron sacrificados. Por tanto, los grupos experimentales son:

- Ratones Vgat-cre GFP + salino
- Ratones Vgat-cre GFP + FGF21 ICV
- Ratones Vgat-cre shD2R + salino
- Ratones Vgat-cre shD2R + FGF21 ICV



### 2.10. SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE FGFR1 EN TANICITOS DE RATONES WT

Para comprobar si el transporte de FGF21 producido en el hígado al hipotálamo se efectúa por medio de los tanicitos, decidimos inhibir la expresión de FGFR1 específicamente en los tanicitos de ratones. Para ello, se realizó una estereotaxia en ventrículo lateral mediante la coadministración de dos vectores virales: el AAV1/2-DIO-CRE que nos ayuda a vehicular el virus a la zona de los tanicitos, junto con el pAAV-SYN-DIO-EGFP (control) o AAV8-SYN-shFGFR1 que silencia selectivamente FGFR1 en los tanicitos. Se realizó un seguimiento de peso corporal e ingesta durante 3 semanas, tiempo que tarda el virus en hacer efecto y a continuación, se realizó una prueba de exposición al frío, introduciendo a los ratones en una cámara fría a 4 °C, durante 6 h, tras las cuales se realizó foto térmica. Posteriormente se anestesiaron los ratones para la obtención del BAT, y a continuación se perfundieron para la obtención de los cerebros.



### 3. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIA

#### 3.1. VÍA INTRAPERITONEAL

La vía intraperitoneal (IP) se usa para administrar volúmenes relativamente grandes, cuando es necesario que se absorban rápidamente, no se precisa anestesia; se realiza en la parte ventrocaudal del animal por debajo del peritoneo. Se inmoviliza el animal por la espalda intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras y se inserta la aguja (25G 5/8" 0,5x16mm) acoplada a una jeringa de 1mL, prácticamente de manera perpendicular a éste, preferiblemente en el lado derecho. Esta vía fue utilizada para la administración de glucosa (2 g/kg; Tabla 10 Ref. 2), insulina (0,50 U/kg; Tabla 10 Ref. 3) piruvato (1,25 g/kg; Tabla 10 Ref. 4), y anestesia.

#### 3.2. VÍA SUBCUTÁNEA

La vía subcutánea (SC) se utiliza para la administración parenteral, y proporciona una lenta liberación, al igual que la vía anterior, no precisa anestesia. Se realiza por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de la pata posterior. Se inmoviliza el animal y se pellizca el lomo del animal con la misma mano; con la otra mano se introduce la aguja (25G 5/8" 0,5x16mm), paralelamente a la columna vertebral. Por esta vía se administró suero fisiológico y ketoprofeno (Tabla 10 Ref. 5) como analgésico y oxitocina (Tabla 10 Ref. 6).

#### 3.3. VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR

La vía ICV se usa para liberar agentes farmacológicos al SNC, no requiere anestesia. El animal se inmoviliza de forma leve intentando reducir al máximo el estrés ocasionado. A continuación, se abre la cánula (implantada 4 d antes de la inyección, explicado en el apartado 3.4) con ayuda de una tijera por el extremo sellado, se introduce una jeringuilla Hamilton (Tabla 11 Ref. 1) y se vacía su contenido una vez está insertada correctamente en la cánula. Al retirar la aguja es necesario extremar el cuidado sujetando la cánula para evitar su desplazamiento del lugar de inserción. Mediante estas cánulas sólo se administraron las sustancias de manera aguda; es decir, se realizó una única administración a través de ellas. Los animales recibieron vehículo (solución salina) o FGF21 (Tabla 10 Ref. 1) ICV.

#### 3.4. CANULACIÓN

Este procedimiento quirúrgico se utiliza para administrar sustancias ICV (explicado en el apartado 3.3). Para ello se utilizaron cánulas fabricadas a partir de un tubo de polietileno de 20G para rata (Tabla 11 Ref. 2) y 22G para ratón (Tabla 11 Ref. 3). Uno de los extremos de la cánula se cortó en forma biselada con un tamaño de bisel de 0,5 mm y una distancia desde el extremo a un tope incorporado previamente de 4 mm para rata y 2,5 mm para ratón. El extremo opuesto de la cánula se selló, mediante la aplicación de calor, hasta el momento de la

administración del tratamiento. El día del experimento este extremo sellado se cortó con una tijera para poder introducir la aguja y llevar a cabo la inyección de la sustancia de interés.

Una vez anestesiados los animales, y tras comprobar su estado de anestesia, se realizó un corte sagital en la piel que recubre la cabeza, dejando la parte superior del cráneo al descubierto. Con ayuda de un mosquito se mantiene la piel retirada para tener una óptima visión del plano quirúrgico. Se limpia bien la zona hasta que el bregma queda al descubierto. El bregma es el punto craneal en el que confluyen las suturas del hueso frontal con los dos temporales, siendo éste el punto de referencia para la implantación de la cánula. A continuación, se realizó una perforación en el cráneo con una broca quirúrgica y la cánula se implanta por su extremo biselado en el lado derecho o izquierdo del ventrículo lateral, en ratas las coordenadas desde el bregma son: -0,9 mm anteroposterior (AP),  $\pm 1,5$  mediolateral (L), -3,50 mm dorsoventral (DV); mientras que en ratón son: -0,6 mm AP,  $\pm 1,2$  mm L, 2 mm DV. Una vez implantada la cánula se añade cianocrilato (Tabla 10 Ref. 7) para que la cánula quede perfectamente fijada y sellada bien toda la zona abierta. Tras la canulación los animales se estabularon individualmente, se dejó un período de recuperación de 3 d en el caso de ratón y de 4 d en rata.

### 3.5. VÍA INTRAVENOSA

La vía intravenosa (IV) se utilizó para la administración por la vena de la cola y la vena yugular.

#### 3.5.1. Administración por la vena de la cola

Esta vía fue utilizada para la administración de vectores virales con el fin de modular la expresión génica a nivel hepático, no requiere anestesia. Las ratas se mantuvieron en un sujetador específico o “*restrainer*” para las inyecciones en la vena de la cola (Tabla 11 Ref. 4). Para poder maximizar el rendimiento de la inyección es necesario previamente dilatar la vena de la cola del animal, mediante la aplicación directa de calor con lámpara de luz infrarroja durante 30 s aproximadamente. A continuación, inyectamos de 500  $\mu$ L de vectores lentivirales diluidos en solución salina, shLuciferasa o shRNA knockdown FGF21 ( $1 \times 10^9$  PFU/mL) con una jeringa con una aguja acoplada (27 G  $\times$  3/8 " 0,40 mm  $\times$  10 mm) sobre las venas laterales de la cola, de forma superficial y prácticamente paralela al eje longitudinal de la cola. La inyección debe realizarse lentamente para evitar la saturación de la vena. Una vez administrado, la aguja debe retirarse con cuidado para no provocar el sangrado, presionando la zona si se produce una ligera hemorragia.

#### 3.5.2. Administración por la vena yugular

Esta vía fue utilizada para la administración de 5 nmol FGF21 recombinante fluorescente (Tabla 10 Ref. 8). Al contrario que ocurría en las anteriores vías, para la administración de las sustancias de interés a través de la vena yugular es necesario recurrir a anestesia general de los animales (explicado a continuación, en el apartado 4). Con el animal anestesiado se localiza fácilmente la vena yugular en el cuello, se sujeta al animal, con una jeringa con una aguja acoplada sobre la vena yugular, de forma superficial y prácticamente paralela al eje longitudinal. La inyección debe realizarse lentamente para evitar la saturación de la vena. Una vez administrado, la aguja debe retirarse con cuidado para no provocar el sangrado, presionando la zona si se produce una ligera hemorragia.

### 3.6. VÍA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Esta vía de administración se utiliza para poder acceder a núcleos concretos del cerebro del animal. También para la administración de las sustancias de interés a través de la vía núcleo-

específica es necesario recurrir a anestesia general de los animales, y realizar la estereotaxia, explicada en el siguiente apartado. Se inyectaron:

- vectores adenovirales D2R knockdown ( $3,5 \times 10^{10}$  PFU/mL) o los controles del vector ( $3,5 \times 10^{10}$  PFU/mL) en LHA/ZI de ratas
- vectores adenovirales asociados Ad-hSyn-DIO-shD2R-EGFP ( $1,0 \times 10^{10}$  PFU/mL) o Ad-hSyn-DIO-EGFP ( $1,0 \times 10^{10}$  PFU/mL) (Vector Builder) bajo promotores cre específicos en LHA/ZI de ratones D2R-cre y Vgat-cre
- vectores adenovirales asociados AAV-SYN-shFGFR1 ( $1,0 \times 10^{13}$  PFU/mL) o pAAV-EF1A-DIO-EYFP ( $2,48 \times 10^{13}$  PFU/mL) (Vector Builder) bajo promotores cre específicos en LHA/ZI y ventrículo lateral de ratones D2R-cre
- AAV1/2-DIO-CRE ( $1,28 \times 10^{13}$  PFU/mL) en ventrículo lateral de ratones de tipo salvaje (WT)

### 3.6.1. Estereotaxia

La estereotaxia es un procedimiento quirúrgico que se utiliza para la administración directa de sustancias en zonas específicas del cerebro, en nuestro caso concretamente en el hipotálamo. Para ello se utilizó un instrumento de estereotaxia (Tabla 11 Ref. 5) que permite localizar tridimensionalmente una zona concreta del cerebro para realizar una administración localizada. Esta administración se realiza bilateralmente en diferentes núcleos hipotalámicos, en nuestro caso en el LHA y ventrículo lateral. El punto de referencia utilizado es el bregma, a partir del cual obtenemos las coordenadas estereotáxicas anteroposterior (AP), mediolateral (L) y dorsoventral (DV), siguiendo las indicaciones del atlas estereotáxico Paxinos G & Watson C de cerebro de rata y ratón, sumamos o restamos las coordenadas correspondientes al núcleo de interés. Cada núcleo hipotalámico tiene una coordenada concreta:

- LHA en rata AP -2,85 mm L  $\pm 2$  mm DV -8,1 mm
- LHA en ratón AP -1,3 mm L  $\pm 1,1$  mm DV -5,2 mm
- Ventrículo lateral en ratón AP -0.3 mm, L  $\pm 1$  mm DV -2,5 mm

Para llevar a cabo este procedimiento es necesario anestesiarse a los animales. Una vez se hizo efectiva la anestesia, los animales se colocaron en el estereotáxico y fijándolos por el cráneo en los planos vertical y horizontal. Para mantener visible el plano quirúrgico se realizó un corte transversal en la piel de la cabeza por detrás de las orejas y se retiró la piel con ayuda de un mosquito. A continuación, se separó el tejido subcutáneo del cráneo con un bisturí, dejando al descubierto la zona circundante al bregma. Localizamos el bregma, tomado como punto de referencia, obteniendo las coordenadas de este punto (AP, L y DV). Posteriormente calculamos las coordenadas donde queremos administrar las diferentes sustancias y nos posicionamos en ellas, con una broca quirúrgica se perfora el cráneo en cada punto de las coordenadas y se procede a la inyección de la sustancia utilizando una jeringa de microinyección Hamilton (Tabla 11 Ref. 6). En cada inyección se inoculó 1  $\mu$ L de sustancia durante 5 min para el caso de ratas y 15 min para el caso de ratones (velocidad de administración: 200 nL/min). Una vez terminada la inoculación se procedió a la sutura del corte en la piel mediante la ayuda de seda de sutura (2-0 para rata y 4-0 para ratón). Los animales fueron estabulados y controlamos su recuperación.



## 4. ANESTESIA

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo los efectos de anestesia general administrada mediante la inyección IP de una solución anestésica disuelta en suero fisiológico, consistente en 80 mg/kg de ketamina (Tabla 10 Ref. 9) y 8 mg/kg de xilacina (Tabla 10 Ref. 9) para rata, y 100 mg/kg de ketamina con 20 mg/kg de xilacina para ratón. El estado de anestesia de cada individuo se verificó comprobando el reflejo podal y palpebral, siendo su ausencia indicativa de que puede realizarse el procedimiento quirúrgico. Tras la cirugía los animales fueron tratados por vía SC con ketoprofeno como medida de analgesia a una dosis de 2,5 mg/kg de peso corporal y también se les administró suero fisiológico subcutáneamente para evitar la deshidratación causada por la anestesia. Tras todos los procedimientos quirúrgicos se realizó un seguimiento exhaustivo de su estado mediante la valoración de su aspecto físico, peso corporal y la ingesta.

## 5. PROCEDIMIENTOS

### 5.1. MONITORIZACIÓN DE PESO E INGESTA

La ingesta y el peso corporal de los animales se determinaron utilizando una balanza de precisión, en función de las necesidades de cada experimento (semanal, diariamente o por horas). Cuando los animales se encontraban estabulados en grupo (estabulación colectiva), la ingesta total del grupo se promedió en función del número de individuos presentes en cada una de las jaulas para tener el dato de ingesta por animal.

### 5.2. MONITORIZACIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL E INTERESCAPULAR

La temperatura corporal se registró con una sonda rectal específica para rata o ratón, conectada a un termómetro digital (Tabla 11 Ref. 7).

Para medir la temperatura interescapular de los animales es necesario afeitar el pelo de esta zona previamente a la realización de la fotografía termográficas (normalmente el día anterior, mínimo 3 h antes), utilizando una cámara infrarroja de alta resolución (Tabla 11 Ref. 8). Las imágenes fueron obtenidas en el rango de 30-40 °C y posteriormente fueron analizadas mediante el software específico de FLIR (Tabla 12 Ref. 1). Finalmente, la temperatura interescapular de cada animal se monitorizó como la temperatura media resultante del análisis de 3 fotografías termográficas.

### 5.3. FENOTIPADO METABÓLICO

Además de la valoración de peso e ingesta, previamente citada, se evaluó la composición corporal mediante un sistema de resonancia magnética nuclear y la medición del EE, LA y tasa de respiración metabólica (RQ) mediante un sistema de calorimetría indirecta.

#### 5.3.1. Sistema de resonancia magnética nuclear

El análisis de la composición corporal se realizó mediante el empleo de un equipo de resonancia magnética de imagen (Tabla 11 Ref. 9); con esto se obtuvieron datos de la composición de masa grasa, masa magra y agua de cada animal. En aquellos tratamientos en los que no fue posible analizar la composición corporal mediante resonancia magnética se

realizó el pesado de los principales depósitos grasos (WAT gonadal y visceral y BAT) *post-mortem* en una balanza de precisión.

### 5.3.2. Sistema de calorimetría indirecta

El sistema de calorimetría indirecta tiene 12 cajas con medición simultánea de calorimetría indirecta (Tabla 11 Ref. 10), que calcula de forma simultánea la ingesta y la RQ y el EE. Previamente los animales son estabulados en cajas de adaptación al sistema durante 48 h para que se adapten al tamaño de la jaula y al sistema de comida y bebida que presenta el sistema de fenotipado. Posteriormente se estabulan en las cajas metabólicas y cada 30 min, durante 48 h, el sistema de calorimetría indirecta toma medidas de ingesta, consumo de O<sub>2</sub> (vO<sub>2</sub>), producción de CO<sub>2</sub> (vCO<sub>2</sub>) y LA entre otros.

Con los valores obtenidos se calculó la RQ de cada individuo durante cada medición dividiendo el vCO<sub>2</sub> entre el vO<sub>2</sub> (vCO<sub>2</sub>/vO<sub>2</sub>). La RQ refleja la relación entre el volumen de CO<sub>2</sub> producido como residuo oxidativo entre el O<sub>2</sub> consumido para la respiración (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>). Los valores de la ratio nos van a determinar cuál es el macronutriente preferente para realizar la oxidación.

El valor de EE resultante (kcal/48 h) fue también normalizado con el peso total del animal (kg) medida al final del proceso. Para asegurar el ajuste entre el EE y el peso corporal, se enfrentaron en un gráfico de dispersión el peso corporal (eje X) y el EE (eje Y) dónde se observará el efecto de la composición corporal sobre el metabolismo basal. Esta observación requiere de un análisis estadístico que pueda reflejar el efecto y para ello se recomienda un análisis de la covarianza (ANCOVA) que elimina la heterogeneidad generada sobre EE por la influencia del peso corporal (variable independiente continua) y el genotipo, tratamiento o estado metabólico (variable discreta independiente).

La se obtiene registrando el movimiento en sentido horizontal y vertical, detectado por unos sensores de luz infrarroja. Se analiza el total de centelleos de luz registrado por estos sensores por cada animal y este valor fue también normalizado con el peso corporal (kg) medida al final del proceso.

Este sistema fue llevado a cabo en termoneutralidad (30 °C con una humedad relativa del 45-52 %) para eliminar el metabolismo adicional necesario para defender la temperatura corporal a temperaturas más bajas.

### 5.4. TEST DE EXPOSICIÓN AL FRÍO

Las ratas y ratones fueron expuestas al frío (4 °C) durante 6 h. Para realizar esta prueba es necesario estabular a los animales en una cámara fría que permanezca a 4 °C durante la realización de éste, antes de estabularlos registramos su temperatura corporal, temperatura interescapular, su peso y la dieta de la que disponen. Posteriormente cada 60 min se registra la temperatura corporal vía rectal, así como la temperatura interescapular. Tras las 6 h volvemos a medir su peso y la dieta sobrante para la valoración del cambio de peso y la ingesta. Con todos los datos obtenidos podemos analizar cómo les afecta el frío en el peso, termogénesis y analizar su capacidad de mantener su temperatura constante.

### 5.5. PRUEBA DE TOLERANCIA AL PIRUVATO, A LA GLUCOSA Y A LA INSULINA

Se realizaron pruebas de tolerancia al piruvato (PTT), a la glucosa (GTT) y a la insulina (ITT) por vía IP mediante la inyección de piruvato (1,25 g/kg), de glucosa (2 g/kg) o de insulina (0,50 U/kg) tras el ayuno nocturno. Para recoger la muestra de sangre para la medición de la glucosa, se hizo un pequeño corte cerca del extremo de la cola de la rata, y las gotas de sangre se recogieron directamente en la tira reactiva colocada en el glucómetro de sangre (Tabla 11 Ref.

11). Las muestras de sangre se recogieron inmediatamente antes y 15, 30, 60, 90 y 120 min en la GTT e ITT, mientras que la PTT se midió a 20, 40, 60, 80, 120 min después de la administración.

### 5.6. ESTUDIO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN BAT

Se realizaron tomografías en ratas Sprague Dawley utilizando el Sistema de Imágenes Preclínicas PET/CT (Tabla 11 Ref. 12) del área de imagen preclínica del CEBEGA. El subsistema de tomografía por emisión de positrones (PET) está formado por tres anillos de ocho detectores basados en cristales monolíticos centelleadores que forman un octágono con un FOV (campo de visión) axial de  $8 \times 14,8$  cm (direcciones transaxial y axial respectivamente) con el fin de generar imágenes PET con resolución espacial de 1,2 mm y una sensibilidad del 10 %. El subsistema de tomografía computarizada (CT) consiste en un tubo de rayos X de microfoco de 50 kVp con un detector de panel plano pixelado 2D centelleador CsI que forma un FOV de  $5,2 \times 5,2$  cm con el fin de generar imágenes CT de 90  $\mu$ m de resolución espacial. El procedimiento se realizó con 3 condiciones:

- 4 ratas con ayuno nocturno a temperatura ambiente
- 8 ratas ad-libitum a temperatura ambiente
- 8 ratas ad-libitum a 4 °C

Para las ratas que estuvieron con exposición al frío los animales permanecieron a 4 °C durante 1 h y media. Luego, la temperatura del BAT se midió utilizando una cámara infrarroja (Apartado 5.2). Hasta la administración 18F-FDG. A todos los animales se inyectaron  $12,32 \pm 0,47$  MBq de radiotrazador 18F-FDG (fluorodesoxiglucosa) en la vena de la cola de cada animal bajo anestesia (2-2,5 % de isoflurano). 18F-FDG es un conocido radiotrazador PET ampliamente utilizado para evaluar el metabolismo celular de la glucosa, formado por una molécula de glucosa con el radionúclido emisor de positrones 18F sustituido por el grupo hidroxilo normal en la posición C-2 en la molécula de glucosa. Los animales se despertaron unos min más tarde y se mantuvieron en reposo durante 35 min a temperatura ambiente o se mantuvieron a 4 °C durante 28 min (las del grupo ad-libitum a 4 °C) con acceso a comida y agua. Después de ese tiempo, los animales fueron nuevamente anestesiados y las adquisiciones estáticas de PET se realizaron a los 45 min después de la inyección (10 min de exploración). Las imágenes PET se reconstruyeron utilizando el algoritmo de maximización de expectativa de máxima verosimilitud (MLEM) con 12 iteraciones y un tamaño de píxel de imagen de  $0,5 \times 0,5 \times 0,5$  mm<sup>3</sup>, incluyendo coincidencias aleatorias y de dispersión y sin corrección de atenuación. El FOV se centró en la región cervical del animal.

Todas las imágenes se analizaron utilizando el software AMIDE (Tabla 12 Ref. 2). El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante el uso de Regiones de Interés Esféricas (ROI) con dimensiones de  $6 \times 6 \times 6$  mm<sup>3</sup> delineadas en el iBAT de cada animal con el fin de capturar el valor máximo de captación 18F-FDG en el iBAT. Finalmente, el Valor de Absorción Estandarizado (SUVmax), que es proporcional al metabolismo de la glucosa, se calculó como el valor máximo de absorción de 18F-FDG normalizado por la actividad inyectada y el peso corporal del animal. La actividad inyectada 18F-FDG se estimó restando la actividad extravasada en la cola.

### 5.7. EXTRACCIÓN DE LECHE MATERNA

Las madres de las camadas después del destete son estabuladas individualmente durante aproximadamente 4 h, para la acumulación de leche. Posteriormente, se seda con isoflurano (Tabla 10 Ref. 11), 5 % para inducción de cámara y 2 % para mantenimiento de mascarilla y se administran 5 UI de oxitocina (Tabla 10 Ref. 6) por vía SC, para provocar mayor producción y

acumulación de leche. A continuación, se masajean las mamas y se obtiene leche directamente en un tubo de 1,5 mL, durante un máximo de 1 h. Posteriormente, la leche obtenida se centrifuga durante 10 min a 800 x g a 4 °C, dejándonos con una fase intermedia, en la cual conseguimos evitar la capa grasa superior, y la capa de restos que queda al fondo del tubo.

### **5.8. PERFUSIÓN CARDIACA**

La perfusión cardiaca es un procedimiento por el que se pueden obtener los cerebros *post-mortem* preservando sus características morfológicas y moleculares lo más parecido posible a las que poseía en estado vivo, esto es necesario para los posteriores estudios inmunohistoquímicos. Tras la anestesia general, se coloca el animal en posición decúbito dorsal y se procede a la apertura de la cavidad abdominal con el fin de exponer el corazón. Localizamos el apéndice xifoideo y se levanta ligeramente con unas pinzas procediendo a la rotura del diafragma y al corte de las costillas. Localizamos la punta del ventrículo izquierdo, en el que realizamos una pequeña incisión y se introduce una cánula hasta la entrada de la aorta. Tras inmovilizar la cánula se secciona la aurícula derecha para abrir el circuito y se bombea una solución de suero fisiológico isotónico para eliminar la sangre del sistema circulatorio. Para continuar tenemos que observar que la salida de la aurícula derecha sólo expulsa el suero salino, y además la coloración del hígado es más pálida. A través de la misma vía se infunde la solución de fijado, una solución de formalina (100 mM) en tampón fosfato (pH=7,4) durante aproximadamente 10 min en ratones y ratas pequeñas, 15 min para ratas adultas. Para comprobar que la fijación se ha completado debemos observar la completa rigidez del animal. Una vez el cuerpo está fijado, se extrajo el cerebro de esos animales y se mantuvieron en solución de fijado durante 24 h a 4 °C. Tras este periodo de tiempo los tejidos se sumergen a etanol al 70 % para posteriormente incluirlos en parafina, o a solución fosfato para inmunofluorescencia en fresco cortado con vibratomo.

## **6. SACRIFICIO**

Al término de los procedimientos los animales fueron sacrificados por decapitación. La sangre troncal fue recolectada e inmediatamente centrifugada, el plasma obtenido fue almacenado a -20 °C para las mediciones bioquímicas, y todos los tejidos fueron retirados rápidamente, congelados inmediatamente sobre hielo seco y mantenidos 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.

## **7. TÉCNICAS ANALÍTICAS**



### **7.1. DISECCIÓN DE ÁREAS CEREBRALES**

Los cerebros se extrajeron e inmediatamente se congelaron y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. A continuación, el cerebro se colocó en una matriz cerebral con una superficie ventral en la parte superior bajo un microscopio de disección. El LHA/ZI y el MBH se extrajeron de todo el hipotálamo cortando entre los límites rostral y caudal de la ME paralelos

a la base del hipotálamo y 1 mm a cada lado lateral de la ME en el caso del LHA/ZI y 0,5 mm a cada lado lateral de la ME en el caso del MBH. La profundidad de cada sección aislada era de aproximadamente 1 mm en los ratones y de 3 mm en el cerebro de rata.

## 7.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICA

### 7.2.1. UCP1 en BAT

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 10 % para su posterior inclusión en parafina mediante un procedimiento estándar. Las muestras de BAT se cortaron y montaron utilizando una sección de 3  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con un procedimiento estándar de hematoxilina y eosina alcohólica. Se utilizó el anticuerpo UCP1 (Tabla 13 Ref. 1). Se cortaron secciones congeladas de 8  $\mu\text{m}$  de hígado con un criostato (Tabla 11 Ref. 13) y se tiñeron en Oil red (Tabla 10 Ref. 12) filtrado durante 10 min. Las secciones se lavaron en agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 3 min y se montaron en un montado acuoso (gelatina de glicerina). Las secciones se observaron y fotografiaron con un microscopio Zeiss AXIO digitalizando las imágenes con una cámara (Tabla 11 Ref. 14) acoplada a dicho microscopio y se cuantificaron con el software Image J (Tabla 12 Ref. 3).

### 7.2.2. Oil Red en hígado

Esta tinción específica de lípidos permite evaluar la esteatosis hepática. Las muestras de tejido hepático congelado fueron cortadas en secciones de 8  $\mu\text{m}$  con un criostato (Tabla 11 Ref. 13), fijadas en 4% paraformaldehído durante 2 h y teñidas en solución *Oil Red* (Tabla 10 Ref. 12) filtrado durante 20 min. Tras ser lavadas en agua destilada, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris durante 5 min y montadas con medio de montaje acuoso.

### 7.2.3. Inmunofluorescencia en cortes cerebrales

Los animales fueron perfundidos (Apartado 5.8). Los cerebros fijados se sumergieron en sacarosa al 30 % y azida sódica (Tabla 10 Ref. 13) al 0,01 % en PBS a 4 °C durante 2 d. A continuación, se cortaron 3 juegos de secciones coronales (40  $\mu\text{m}$  de espesor) en un criostato (Tabla 11 Ref. 13) y se almacenaron a -20 °C en crioprotector.

Un conjunto de secciones flotantes de cada animal se lavó tres veces en TBS 0.1M durante 10 min cada una y se incubó en solución de bloqueo (suero de burro al 2 % + 0.3 % Triton X-100 (Tabla 10 Ref. 14) en TBS 0.1 M durante 60 min. Luego, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (GFP, cFOS, FGFR1, VGAT, Vimentin. Tabla 13 Ref. 2-6). en solución de bloqueo durante 24 h a 4 °C. Después de la incubación en el anticuerpo primario, las secciones se lavaron con TBS 0.1 M tres veces durante 10 min cada una y luego se incubaron en el anticuerpo secundario correspondiente: Cy3 burro anti-conejo (Tabla 13 Ref. 7) y cabra anti-pollo Alexa 488 (Tabla 13 Ref. 8) durante 60 min a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron y se cubren con la solución de montaje fluorogel y el cubreobjetos. Las imágenes confocales se recogieron con un microscopio confocal (Tabla 11 Ref. 15).

En el caso del FGF21 recombinante fluorescente (Tabla 10 Ref. 8). Los ratones fueron decapitados 1 min después de la inyección y la inmersión cerebral fijada en paraformaldehído (PFA) al 4 % (0.1 M PBS pH 7.4) durante 2 h y luego se colocó en el mismo fijador +20 % de sacarosa durante la noche a 4 °C. Los cerebros se congelaron en isopentano refrigerado por nitrógeno líquido y se recolectaron secciones de criostato de 30  $\mu\text{m}$  de espesor en portaobjetos de vidrio supercongelado. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss Axio (Tabla 11 Ref. 14). El FGF21 fluorescente se fotografió utilizando un divisor de haz de 660 nm con

una longitud de onda de excitación establecida en 625/655 nm y una longitud de onda de emisión establecida en 665/715 nm.

### **7.3. NIVELES DE FGF21 EN PLASMA Y LECHE**

Los niveles circulantes de FGF21 fueron medidos en plasma y leche materna de las ratas del modelo de lactancia materna. La sangre extraída durante el sacrificio fue centrifugada y se obtuvo el plasma. Así mismo la leche materna fue centrifugada, y la fracción obtenida fue medida. Los niveles de FGF21 se determinaron mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) utilizando kit comercial. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 3,81 pg/mL y los resultados se presentan en pg/mL (Tabla 13 Ref. 9).

### **7.4. NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA**

Los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres no esterificados (NEFAS) se determinaron mediante kit comercial específico (Tabla 10 Ref. 15), siguiendo los protocolos del fabricante, que se fundamentan en una reacción enzimática colorimétrica que es evaluada con un espectrofotómetro (Tabla 11 Ref. 16).

### **7.5. ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO POR PCR A TIEMPO REAL**

#### **7.5.1. Extracción del ARN y cuantificación**

Para la extracción del ARN de tejido se utilizó el reactivo TRIzol™ (Tabla 10 Ref. 16) que permite la degradación proteica y el aislamiento de los ácidos nucleicos. Aproximadamente 0.1 g de hígado fue homogeneizado en TRIzol™ (800 µL) mecánicamente con ayuda de una bola de acero mediante el uso de un homogeneizador mecánico (Tabla 11 Ref. 17), durante 3 min a 30 Hz. Tras la homogenización, la muestra se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 8 °C y se recogió el sobrenadante. A continuación, se aisló el ARN añadiendo 160 µL de cloroformo (Tabla 10 Ref. 17), se agitó por inversión y se incubó aproximadamente durante 3 min a temperatura ambiente hasta ver bien diferenciadas las dos fases. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4 °C para que se separen la fase acuosa (ARN) de la fase orgánica (proteínas y lípidos). Se recogió el sobrenadante (fase acuosa) con cuidado de no tocar la interfase blanquecina (ADN). Se añadieron 400 µL de isopropanol (Tabla 10 Ref. 18), se agitó el tubo por inversión y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por decantación. A partir de esta centrifugación la muestra debe permanecer siempre en hielo. Posteriormente, se añadieron 800 µL de etanol 75 % diluido en H<sub>2</sub>O DEPC (H<sub>2</sub>O bidestilada con dietilpirocarbonato 0,1 %). Se centrifugó a 7500 x g durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante por decantación. Posteriormente cuando la muestra estuviera seca, se resuspendió el pellet en 25 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Finalmente, se cuantificó el ARN mensajero (ARNm) en un NanoDrop (Tabla 11 Ref. 18).

#### **7.5.2. Purificación del ARN: tratamiento con DNAsas**

Se utilizó el kit comercial Ambion DNA-free™® (Tabla 10 Ref. 19) siguiendo el protocolo del fabricante. Para el tratamiento se calculó el volumen necesario para retrotranscribir 2 µg de ARN en un volumen máximo de 12,5 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Se añadió a la muestra una mezcla constituida por 1,5 µL de tampón y 1 µL de DNasa I.

A continuación, se incubó el tubo en el termociclador (Tabla 11 Ref. 19) durante 30 min a 37 °C. Tras la incubación se pasó el tubo a hielo. Se añadieron 2 µL del reactivo de inactivación

de la DNasa y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Tras este tiempo se centrifugó la muestra a 10000 x g durante 1,5 min y se recogieron 10 µL de sobrenadante.

### 7.5.3. Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en amplificar el ARN extraído en forma de ADN complementario (ADNc). Para llevar a cabo la retrotranscripción se utilizó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Tabla 10 Ref. 20). De este modo se amplifica la cantidad de ARN de la muestra y se asegura la estabilidad de la molécula durante la PCR a tiempo real.

En primer lugar, se preparó una mezcla constituida por 2 µL de tampón de retrotranscripción 10x, 0,8 µL de mezcla de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) 25x (100 mM), 2 µL de cebadores de retrotranscripción aleatorios 10x, 1 µL de transcriptasa reversa MultiScribe y 4,2 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. A continuación, se pipetearon 10 µL de dicha mezcla sobre 10 µL de la muestra y el tubo se colocó en el termociclador (Tabla 11 Ref. 19) utilizando el siguiente programa: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C, 5 min a 85 °C; y se mantuvo a 4 °C hasta la recogida de las muestras.

### 7.5.4. PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa (qPCR) permite la cuantificación de la expresión génica en términos relativos, expresando el cambio en los niveles de expresión de ARNm de un gen en forma de ADNc comparándolo con los niveles de expresión de ARNm de un gen control o normalizador. Las sondas comerciales utilizadas (Tabla 2) están marcadas con fluorocromos: donador y aceptor. Se utilizaron los reactivos Taqman (Tabla 10 Ref. 21). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia de transferencia de energía fluorescente (FRET) entre las dos moléculas. El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR fue TAMRA, que posee un máximo de absorción de 560 nm y un máximo de emisión de 580 nm. Se preparó la mezcla (1 µL de sonda y 10 µL de la Taqman Universal PCR Máster Mix (Tabla 10 Ref. 22) por pocillo para cada gen, tanto para el gen problema como para el gen constitutivo. Después de añadir 11 µL de mezcla por pocillo, se adicionaron 9 µL del ADNc correspondiente obtenido tras la retrotranscripción a cada pocillo de la placa. Finalmente, la placa se introdujo en el equipo de q-PCR (Tabla 11 Ref. 20) y el protocolo usado para la amplificación consistió en 40 ciclos de 2 min a 50 °C; 10 min a 95 °C; 10 min a 95 °C; 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. En todos los experimentos se analizaron las muestras por duplicado. Los resultados se analizaron utilizando el software proporcionado por el aparato. Para determinar la concentración de ADNc en cada muestra se analiza umbral de ciclos (Ct). El Ct es el ciclo a partir del cual se amplificado la mitad del contenido del ADNc. El valor del Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc. Los niveles de expresión de todos los genes se normalizaron según los niveles de expresión del gen constitutivo fosforribotransferasa hipoxantina 1 (HPRT1) que se usa como gen control. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias relativos al valor medio del grupo control.

Tabla 2. Sondas utilizadas en la PCR a tiempo real

Gen	Cebador	Secuencia
HPRT1	Directo	5'-AGCCGACCGTTTCTGTCAT -3'
	Reverso	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC -3'
	Sonda	5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'
FGF21	Directo	5'-CACTCTGGTACCCAGGACCAATAA-3'
	Reverso	5'-CCCTCAACTTTTCTCTGGCTAGGT-3'
	Sonda	5'-ACAAGAGTAGAGGTGGTGGCAGAATGCC-3'

## 7.6. CLASIFICACIÓN FACS

La región tuberal del hipotálamo de ratones Vgat-cre inyectados con adenovirus EGFP en LHA/ZI (coordenadas: AP: -1,3 mm, L:  $\pm$  1,1 mm y DV: -5,2 mm del atlas del ratón Paxinos) fue microdisecionada y disociada enzimáticamente utilizando el sistema de disociación de papaína (Tabla 10 Ref. 23) para obtener suspensiones de células individuales. El clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) se realizó utilizando un citómetro (Tabla 11 Ref. 21). La decisión de clasificación se basó en las mediciones de la fluorescencia de EGFP (excitación 488 nm; 50 mW; detección: Paso de banda de EGFP 525/30 nm, paso de banda de autofluorescencia 695/40 nm) comparando las suspensiones celulares de sitios cerebrales no infectados (es decir, la corteza) y de sitios cerebrales infectados (es decir, el hipotálamo), como se indica en la Figura 5A. Para cada animal se clasificaron de 150 a 200 células positivas para EGFP directamente en 10 L de tampón de extracción: 0,1 % Triton X100 (Tabla 10 Ref. 14) y 0,4 unidades/L de RNasa OUT<sup>TM</sup> (Tabla 10 Ref. 24). Los ARN obtenidos de las células negativas y positivas para la EGFP clasificadas por FACS se transcribieron de forma inversa utilizando RT de alta capacidad y se realizó un paso de preamplificación lineal utilizando el protocolo del kit TaqMan® PreAmp Máster Mix (Tabla 10 Ref. 25). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el sistema de PCR rápida en tiempo real (Tabla 11 Ref. 22) utilizando ensayos de expresión genética TaqMan® específicos para cada exón: FGFR1 (Fgfr1-Mm00438930\_m1). Genes de control: R18S (r18S-Mm03928990\_g1) y Actina (Actb-Mm00607939\_s1).

## 7.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

### 7.7.1. Extracción de proteína totales

Partiendo de las muestras obtenidas tras el sacrificio, que fueron conservadas hasta su uso a -80 °C, se separó una porción del tejido que va a ser procesado y el resto se volvió a congelar. El tejido se introduce en un tubo de 2 mL con cierre de seguridad y se le añade una bola de acero y un volumen determinado de tampón de lisis RIPA (Tabla 3) con un cóctel de inhibidores de proteínas (Tabla 10 Ref. 26) y un cóctel de fosfatasas (Tabla 10 Ref. 27), ambos a una dilución 1/100. Las muestras se homogeneizaron por un proceso de disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (Tabla 11 Ref. 17). Todo el procedimiento se lleva a cabo en frío, a continuación, se realizan centrifugaciones a 4 °C y 14000 rpm; en hígado se realiza una centrifugación de 30 min, quedándonos con el sobrenadante (extracto proteico), mientras que el BAT requiere más centrifugaciones (3-5) de 10 min para la eliminación de la grasa blanca que queda por encima del sobrenadante. Se congelaron los extractos a -80 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 3. Composición del tampón de lisis RIPA

Tampón RIPA	
Tris-HCl pH 7,4	200 mmol/L
NaCl	130 mmol/L
Glicerol	10 % (v/v)
SDS	0,1 % (v/v)
Tritón X-100	1 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L
Antiproteasas	1 $\mu$ l/mL
Antifosfatasas	1 $\mu$ l/mL



### 7.7.2. Cuantificación de proteína totales

La determinación de la concentración de proteína en las alícuotas obtenidas en la extracción se realizó mediante el kit de cuantificación de proteínas (Tabla 10 Ref. 28), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se realizó una dilución 1:25 (hígado y BAT) o 1:10 (LHA) de las muestras en agua miliQ. Asimismo, se realizó la recta patrón mediante diluciones seriadas del estándar del kit. Finalmente se procedió a la lectura de absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro (Tabla 11 Ref. 16) para determinar la concentración proteica de cada muestra y se prepararon alícuotas a la concentración necesaria en función de la proteína que iba a ser analizada.

### 7.7.3. Preparación de las muestras para electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) consiste en la separación de las proteínas en función de su masa molecular en base a su migración en un campo eléctrico. Para ello es necesario eliminar la estructura cuaternaria y la carga de las proteínas, por lo que las muestras se prepararon en tampón de carga (SB) 5x (composición en la tabla 4), que permite la desnaturalización de las proteínas eliminando los puentes disulfuro (efecto del  $\beta$ -mercaptoetanol), dota de carga negativa a todas las proteínas en proporción a su tamaño (efecto del SDS) y aumenta la densidad de la muestra para facilitar su carga en el gel (efecto del glicerol). Además, permite identificar el frente de migración ya que contiene el colorante azul de bromofenol.

Tabla 4. Composición del tampón de carga 5x

Tampón de carga 5x	
Tris-HCl pH 6,8	400 mM
SDS	10 % (p/v)
Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,5 % (p/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	5 % (v/v)

La cantidad de proteína total de la muestra utilizada varió en función del tipo de tejido: 50  $\mu$ g en hígado, 25  $\mu$ g en BAT y 12  $\mu$ g en el LHA. Las muestras se diluyeron en agua miliQ para obtener un volumen total de 20  $\mu$ L, al que finalmente se le añadió 5  $\mu$ L de tampón de carga 5x. Tras añadir el tampón de carga, y siempre previamente a la realización de la electroforesis, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min en un termo-bloque para producir su completa desnaturalización.

### 7.7.4. Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE consiste en la separación de las proteínas por su peso molecular. Se realizó en un gel que consiste en una estructura tridimensional, en forma de red, formada por la polimerización de poliacrilamida. El proceso de polimerización se cataliza con persulfato amónico (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED). La concentración de acrilamida y bis-acrilamida en el gel determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y el grado de migración de las proteínas según su tamaño. Al aplicarle una corriente eléctrica, las proteínas migran a través del gel hacia el polo positivo de la corriente, separándose por su peso molecular en gradiente de mayor a menor. El gel está formado por dos fracciones: una fracción concentradora y una fracción separadora. En la fracción concentradora el porcentaje de acrilamida es siempre 5 % de acrilamida/bis-acrilamida y se localiza en la parte superior sobre el que se incluye un peine para

formar los pocillos y poder introducir la muestra (Tabla 5). Se prepararon a partir de soluciones stock de acrilamida/bisacrilamida 29:1 30 % (0,83 mL); tris 1.5 M pH 6,8 (0,63 mL); SDS 10 % (50  $\mu$ L); APS 10 % (50  $\mu$ L); y TEMED (5  $\mu$ L). En la fracción separadora los porcentajes de acrilamida variaron entre 10 % y 12 % en función del tamaño de la proteína de interés (Tabla 6).

**Tabla 5.** Composición del gel SDS-PAGE concentrador

Gel separador (10 mL)	10 %	12 %
H <sub>2</sub> O miliQ	4 mL	3,3 mL
Acrilamida-BIS 30%	3,3 mL	4 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,1 mL
APS 10%	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

**Tabla 6.** Composición del gel SDS-PAGE separador

Gel concentrador 5% (3 mL)	
H <sub>2</sub> O miliQ	2,1 mL
Acrilamida-BIS 30%	0,5 mL
Tris-HCl 1M pH 6,8	0,38 mL
SDS 10%	0,03 mL
APS 10%	0,03 mL
TEMED	0,003 mL

Los geles se montaron en la cubeta de electroforesis (Tabla 11 Ref. 23) y se sumergieron en tampón de electroforesis (Tabla 7) que permite la transmisión del voltaje.

**Tabla 7.** Composición del tampón de electroforesis

Tampón de electroforesis	
Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1 % (p/v)

Previamente a la carga de las muestras en el gel se agitaron y se calentaron a 95 °C durante 5 min. En cada pocillo del gel se cargaron 16  $\mu$ L de muestra. Se utilizó una calle para cargar un marcador de pesos moleculares (Tabla 10 Ref. 29). En cada gel se cargaron siempre muestras de todos los grupos experimentales.

Una vez cargadas las muestras en el gel se sometieron a un campo eléctrico (voltaje constante de 60 V - 120 V y amperaje de 180 mA) conectando la cubeta de electroforesis (Tabla 11 Ref. 23) a una fuente de alimentación (Tabla 11 Ref. 24) en el que se indujo la migración de las proteínas hacia el cátodo. Se detuvo la electroforesis cuando el frente de migración llegó a una distancia aproximada de unos 0,5 cm del final del gel.

### 7.7.5. Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas deben ser transferidas a una membrana para poder realizar el análisis de expresión de cada proteína; para ello se someten a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde se realizarán las

incubaciones con los diferentes anticuerpos. Se realizó una transferencia de tipo húmeda, para la cual se utilizó el modelo de transferencia húmeda (Tabla 11 Ref. 25) y membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Este tipo de membranas tienen que ser activadas previamente a su uso en metanol durante 5 min, lavadas en agua destilada durante 5 min y sumergidas en tampón de transferencia 5 min. La transferencia se realizó en tampón de transferencia a 4 °C (tabla 8) a 200 mA constantes en frío. El tiempo de la transferencia varió en función del tamaño de la proteína analizada. El tiempo de transferencia varía en función del peso de las proteínas, en nuestro caso se realizó durante 1 h y 30 min, con un amperaje constante de 0.20 mA por cubeta.

**Tabla 8.** Composición del tampón de transferencia

Tampón de transferencia	
Tris	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20 % (v/v)

#### 7.7.6. Tinción con rojo Ponceau

La eficacia de la transferencia se comprobó mediante la tinción Ponceau (rojo Ponceau S 0.1 % (p/v), ácido acético 1 %) (Tabla 10 Ref. 30). Se lavó el exceso con solución de lavado de Ponceau (ácido acético 1 %). A continuación, las membranas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, 0.1% detergente Tween® 20 (PBST).

#### 7.7.7. Inmunodetección

Primeramente, se realiza el bloqueo de la membrana recién transferida, para evitar posibles uniones inespecíficas, para ello usamos solución de albumina de suero bovino (BSA; Tabla 10 Ref. 31) que se une a todas las zonas de la membrana en las que no tenemos proteína transferida. Para ello la membrana es incubada a temperatura ambiente durante 1 h en agitación en una solución de BSA al 5 % disuelta en el PBST. En algunas ocasiones se cortó la membrana, tomando siempre como referencia el marcador de pesos moleculares, para poder detectar en la misma membrana proteínas de diferentes pesos moleculares simultáneamente.

Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo específico contra la proteína a detectar ( $\beta$ -actina, FGF21, D2R, OX-A/B, PGC1 $\alpha$ , UCP1. Tabla 13 Ref. 10-15) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche en agitación a 4 °C.

Tras la incubación se retira el anticuerpo y se realizan tres lavados de 10 min cada uno con PBST. A continuación, se incuba la membrana durante 1 h con un anticuerpo secundario asociado a peroxidasa que reconoce la parte constante del primario para detectar la presencia de la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario. Se diluye en solución de bloqueo. El tipo de secundario utilizado vendrá determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario (anti-conejo, anti-ratón. Tabla 13 Ref. 16 y 17).

Tras la incubación en anticuerpo secundario, el anticuerpo fue retirado y la membrana se lavó (del mismo modo que tras la incubación con el anticuerpo primario) con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

La unión antígeno-anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia. Para ello la membrana se incubó con el sustrato de la peroxidasa y un potenciador de quimioluminiscencia (Tabla 10 Ref. 32) en proporción 1:1 durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Inmediatamente después se procedió al revelado de la membrana. El revelado y obtención de imágenes se realizó con el equipo ChemiDoc Imaging System (Tabla 11 Ref. 26).

En el caso de que la proteína analizada presentase un peso molecular cercano a la proteína utilizada como control de carga (motivo por el cual no se cortó la membrana para detectar simultáneamente ambas proteínas) se llevó a cabo el estriado de dicha membrana, proceso que rompe la unión entre el anticuerpo primario y secundario. Para ello se incubó la membrana en una solución de BSA 5 % y azida sódica 1 % (Tabla 10 Ref. 13) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBST de 15 min y se incubó la membrana (toda la noche a 4 °C en agitación) con el anticuerpo primario que reconoce la proteína utilizada como control de carga.

Por último, se utilizó el software Image J (Tabla 12 Ref. 3), para cuantificar el análisis de western blot. Para determinar la cantidad relativa de proteína de cada muestra el software analiza la densidad óptica de la señal. El área de medición debe ser igual para todas las muestras y la medición de cada una de las muestras debe ser corregida por la densidad óptica propia de la membrana en una región adyacente a la señal de las muestras (generalmente conocido como fondo de la membrana). Los valores obtenidos se relativizaron respecto al control de carga utilizado y el valor final fue normalizado respecto al grupo control de cada experimento, y se expresa en porcentaje.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los experimentos fueron analizados mediante el programa estadístico *IBM SPSS Statistics Prism* (Tabla 12 Ref. 4). Los datos aparecen expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El tamaño muestral de cada grupo experimental aparece detallado en los pies de figura del apartado Resultados. Se excluyeron las muestras y/o animales cuyo valor se desviaba más de 2 veces la desviación estándar o cuando se observara un comportamiento inadecuado durante el procedimiento experimental.

Para la prueba de normalidad de la distribución de los datos, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y si las varianzas son homogéneas la prueba de Levene. En base a lo obtenido en estas pruebas se aplicaron pruebas paramétricas (distribución normal y varianza homogénea) o no paramétricas:

- Test T de student: compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal y varianzas homogéneas.
- ANOVA: se utilizó la prueba el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si había diferencia entre las medias de tres o más grupos experimentales asumiendo una distribución normal. En caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, se realizó una prueba *post-hoc* de Tukey para comprobar qué medias son las que causaron significación.
- ANCOVA: es una fusión del ANOVA y de la regresión lineal múltiple. Es un procedimiento estadístico que permite eliminar la heterogeneidad causada en la variable de interés (variable dependiente) por la influencia de una o más variables cuantitativas (covariables).
- Test Mann-Whitney: permite comparar la media de dos poblaciones que no siguen una distribución normal ni sus varianzas son homogéneas.

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

Las gráficas fueron realizadas con el programa Graphpad (Tabla 12 Ref. 5).

## 9. REFERENCIAS COMERCIALES

Tabla 10. Referencias de reactivos y péptidos

	Producto	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Ref. 1	FGF21 Human	PROSPECT	CYT-474
Ref. 2	D-glucose	Sigma-Aldrich	G8270
Ref. 3	Insulin (Actrapid)	Novo Nordisk	EU/1/02/230/001
Ref. 4	Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	P2256
Ref. 5	Ketoprofeno, Orudis 100 mg	Sanofi Aventis	FT_52097
Ref. 6	Oxitocina sytocinon 10 UI/mL	Alfasigma S.p.A.	607229
Ref. 7	SuperGlue-3	Loctite	2640076 es-ES
Ref. 8	Fluorescent recombinant FGF21	Cisbio Bioassays	Fr-FGF21
Ref. 9	Ketamina, Imalgene 1000 inyectable	Merial	2529 ESP
Ref. 10	Xilacina Rompun 2%	Bayer Health Care	1967 ESP
Ref. 11	Isoflorano	Abcam	ab23841
Ref. 12	Oil Red	Sigma-Aldrich	102419
Ref. 13	Sodium azide	sigma-aldrich	S2002
Ref. 14	Triton X100	Sigma-Aldrich	9036-19-5
Ref. 15	NEFA-HR	Wako	91898
Ref. 16	TRIZOL™ Reagent	Invitrogen	15596026
Ref. 17	Cloroformo	Sigma-Aldrich	C2432
Ref. 18	2-propanol	Sigma-Aldrich	I9516
Ref. 19	Ambion DNA-free™®	Life Technologies	AM1906
Ref. 20	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
Ref. 21	TaqMan™ Universal PCR Master Mix, no AmpErase™ UNG	Applied Biosystems™	4324018
Ref. 22	Taqman Universal PCR Máster Mix Applied Biosystems	Applied Biosystems™	4305719
Ref. 23	Papain Dissociation System	Worthington	LK003150
Ref. 24	RNasaOUTTM	Life technologies	10777019
Ref. 25	TaqMan® PreAmp Máster Mix	Applied Biosystems	P/N 4366128
Ref. 26	Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	P8340
Ref. 27	Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	P0044
Ref. 28	RC DC Protein Assay	Bio-Rad	5000122
Ref. 29	Precision Plus Protein Standars-Dual Color	Bio-Rad	1610394
Ref. 30	Ponceau S Red	Sigma-Aldrich	P3504
Ref. 31	Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A9418
Ref. 32	Clarity Western ECL Substrate	BioRad	1705061

Tabla 11. Material y Equipos

	Producto	Proveedor	Referencia/modelo
Ref. 1	Hamilton™ Jeringa Microliter	Hamilton™ 80135	7001 KH SYR
Ref. 2	Tubo de polietileno de 20 G (1,09 mm de diámetro externo y 0,38 mm de diámetro interno)	Becto-Dickinson	PE-20
Ref. 3	Tubo de polietileno de 22 G (0,58 mm de diámetro interno y 0,96 mm de diámetro externo)	Becto-Dickinson	PE-50
Ref. 4	Tailveiner	Bioseb Lab	TV-150-STD
Ref. 5	Stereotaxic for Rat and Mouse	David Kopf Instruments	963
Ref. 6	Hamilton™ Neuros™ 7000 Series Modified Microliter Syringes	Hamilton™ 65458-01	12673685
Ref. 7	Microprobe Thermometer	Physitemp	BAT-12
Ref. 8	Compact-Infrared-Thermal Imaging-Camera	FLIR	E60bx: 9006600
Ref. 9	Body Composition Analyzer	EchoMRI™	EchoMRI™-500
Ref. 10	LabMaster system	TSE Systems	LabMaster system
Ref. 11	Glucocard G + meter	A. Menarini diagnóstico	98/79/EC
Ref. 12	Sistema de Imágenes Preclínicas PET/CT	Bruker Biospin	PET/CT Albira
Ref. 13	criostato	Leica	CM1850 UV
Ref. 14	microscopio Zeiss AXIO	AXIO	AxioCam MRC
Ref. 15	MICROSCOPIO CONFOCAL	Leica	A0B5-SP5
Ref. 16	Microplate Spectrophotometer	Biotek Instruments, Inc	Epoch 2
Ref. 17	Tissuelyser II	Qiagen	85300
Ref. 18	NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific	ND-2000
Ref. 19	Illumina Eco Real Time PCR System	Cultek	J4ECORT48
Ref. 20	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems	15341295
Ref. 21	FACSAria™ Cell Sorter	BD Bioscience, Inc	FACSAria III
Ref. 22	7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems	4351405
Ref. 23	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad	1658005EDU
Ref. 24	PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad	1645052
Ref. 25	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad	1703930
Ref. 26	ChemiDoc Imaging System	BioRad	17001402

Tabla 12. Programas informáticos

	Programa	Proveedor	Referencia
Ref. 1	Software FLIR Tools	FLIR	RRID:SCR_016330
Ref. 2	Software Amides	Amide	RRID:SCR_005940
Ref. 3	Software ImageJ NIH Image versión 1.8	National Institutes of Health	RRID:SCR_003070
Ref. 4	IBM SPSS Statistics		RRID:SCR_019096
Ref. 5	GraphPad Prism 6		RRID:SCR_002798

Tabla 13. Referencias comerciales de anticuerpos y Elisa

	Anticuerpo	Casa comercial	Referencia/RRID
Ref. 1	UCP1 (rabbit)	Abcam	ab23841 RRID: AB_2213764
Ref. 2	GFP (chicken)	Invitrogen A10262	10524234 RRID: AB_2534023
Ref. 3	cFOS (rabbit)	Abcam	ab10646 RRID: AB_297367
Ref. 4	FGFR1 (rabbit)	Synaptic Systems	13101 RRID: AB_3289938
Ref. 5	VGAT (rabbit)	Santa Cruz	sc-52 RRID: AB_2106783
Ref. 6	Vimentin (chicken)	Merck Millipore	AB5733 RRID: AB_11212377
Ref. 7	Cy3 donkey anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Labs	711-165-152 RRID: AB_2307443
Ref. 8	Goat anti-chicken Alexa 488	Abcam	ab150169 RRID: AB_2636803
Ref. 9	Elisa fgf21	R&D Systems	MF2100 RRID: AB_2783730
Ref. 10	$\beta$ -ACTIN (mouse)	Sigma-Aldrich	A5316 RRID: AB_476743
Ref. 11	FGF21 (rabbit)	Abcam	ab64857 RRID: AB_2104485
Ref. 12	D2R (rabbit)	Abcam	ab85367 RRID: AB_10674739
Ref. 13	OX A/B (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	sc-28935 RRID: AB_784981
Ref. 14	PGC1 $\alpha$ (rabbit)	Abcam	ab54481 RRID: AB_881987
Ref. 15	UCP1 (rabbit)	Abcam	ab10983 RRID: AB_2241462
Ref. 16	Goat Anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Labs	111-035-003 RRID: AB_2313567
Ref. 17	Goat Anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Labs	115-035-003 RRID: AB_10015289



# RESULTADOS



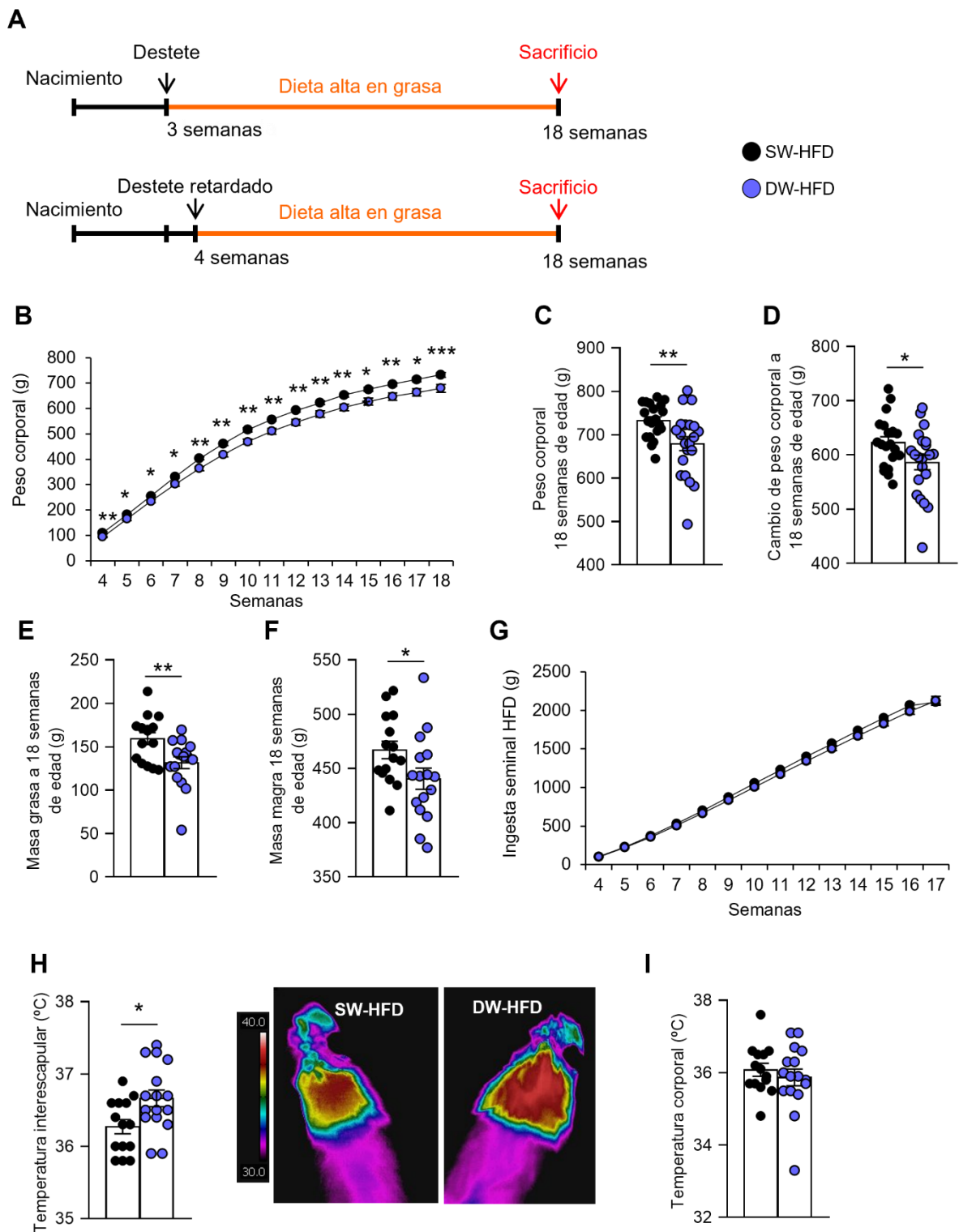
## **1. LA LACTANCIA MATERNA PREVIENE LA OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA MEDIANTE EL INCREMENTO DEL GASTO ENERGÉTICO Y LA TERMOGÉNESIS**

En el grupo de investigación se desarrolló el modelo animal DW en ratas, con cuatro grupos experimentales, partiendo de dos grupos experimentales con diferente tiempo de lactancia, SW (21 d) y DW (28 d), posteriormente se subdividieron por la dieta con las que se les alimenta tras el destete, CD o HFD. Con este modelo llegaron a la conclusión que la lactancia materna prolongada en rata protege frente el desarrollo de DIO en la edad adulta, disminuyendo el peso corporal y mejorando el perfil lipídico. Los efectos protectores fueron más evidentes en los grupos alimentados con dieta hipercalórica.

### **1.1. LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA ACTIVA LA TERMOGÉNESIS DESDE EL DESTETE HASTA LA EDAD ADULTA**

Puesto que en el modelo general las diferencias más evidentes se observaron en aquellos que tienen DIO (alimentados con HFD), este trabajo se centra en los siguientes grupos experimentales: SW (3 semanas) seguidos de HFD (SW-HFD) y DW (4 semanas) con HFD (DW-HFD).

En primer lugar, se establecieron los grupos experimentales descritos y se monitorizó su peso corporal hasta la edad adulta (Figura 1A). Aquellos animales que fueron expuestos a una DW presentaron un menor peso corporal y un menor incremento de peso hasta la edad adulta, que aquellas ratas con SW (Figura 1B-1D). La resonancia magnética reveló que los animales DW-HFD presentan valores más bajos de masa grasa (Figura 1E) y de la masa magra (Figura 1F), de forma independiente de la ingesta (Figura 1G) comparados con los SW-HFD. Así mismo, en el grupo DW-HFD se observó una mayor activación del programa termogénico del BAT, tal como se observa en el análisis de las fotos termográficas, en las que DW-HFD presenta un incremento significativo de temperatura interescapular respecto de sus controles (Figura 1H), sin cambios en la temperatura corporal (Figura 1I).

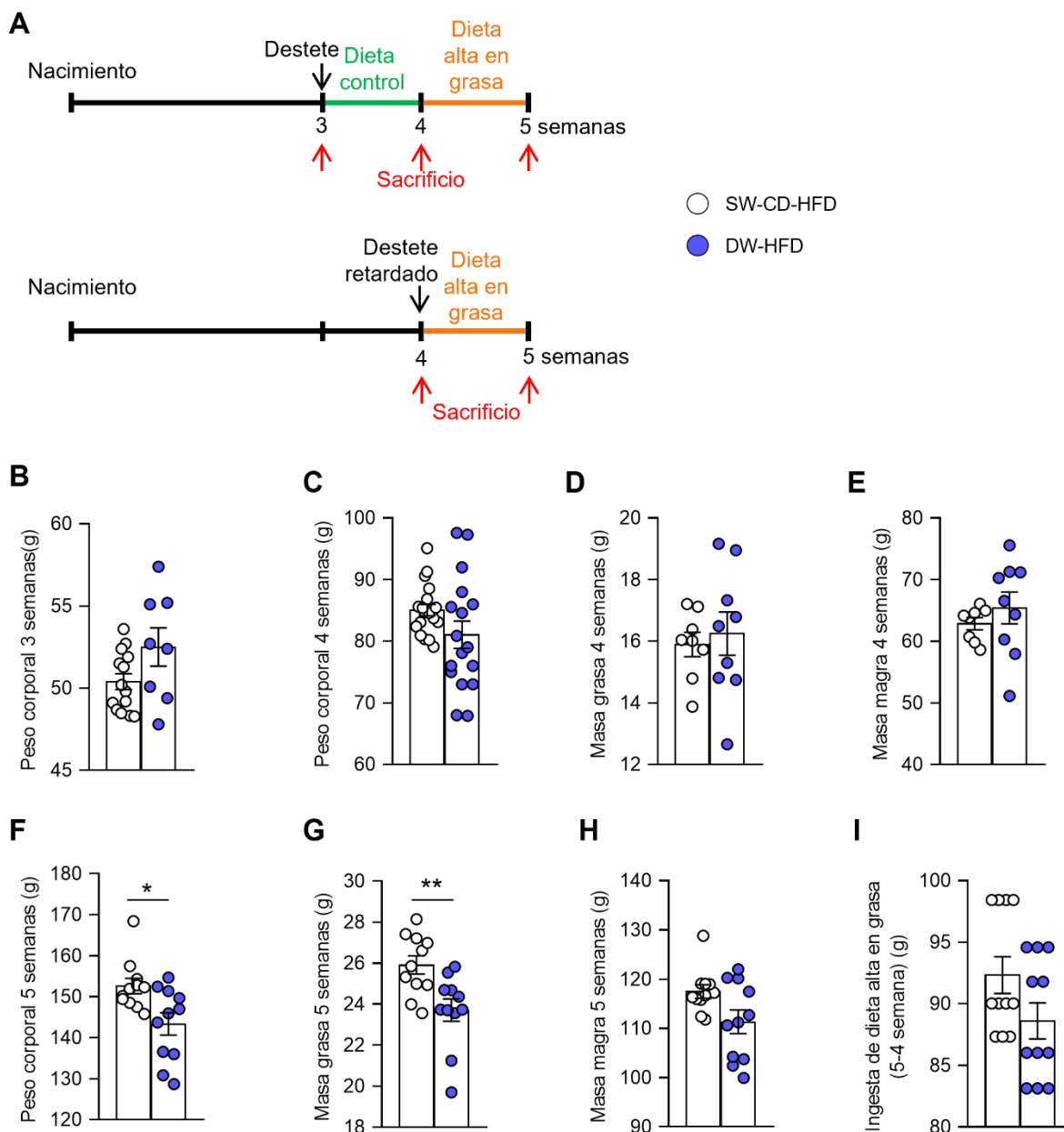


**Figura 1.** Efectos de DW en ratas alimentadas con HFD tras el destete en la edad adulta. Esquema del modelo animal (A) seguimiento de peso corporal hasta la edad adulta (n=20-21) (B) peso corporal a las 18 semanas de edad (n=20-21) (C) cambio de peso corporal (n=20-21) (D) masa grasa (n=15-16) (E) masa magra (n=15-16) (F) ingesta acumulada (n=20-21) (G), temperatura interescapular y fotografías termográficas representativas (n=14-16) (H) y temperatura corporal (n=14-16) (I) a las 18 semanas de edad. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Test T de *student* (B-I).

Puesto las ratas SW empiezan la HFD a las 3 semanas de edad, mientras que las DW empiezan a las 4 semanas, quisimos descartar la posibilidad de que estos efectos observados en la edad adulta fuesen debidos a la semana extra de HFD de las ratas con SW y no a la DW. Teniendo en cuenta que mientras permanecen en la camada con la madre las ratas DW ingieren una alimentación mixta durante la semana 4, que consiste en leche materna y dieta estándar (ya que pueden acceder a la comida sólida de la madre en la jaula), con el fin de que la ingesta sea lo más homogénea posible, a las ratas con SW se las alimentó con CD durante esta semana 4. De esta manera los dos grupos iniciaron la ingesta de HFD en la semana 5, evitando así la semana adicional de HFD en ratas con SW (Figura 2A). Se obtuvieron los siguientes grupos:

- SW-CD-HFD: destete a 3 semanas, a continuación, una semana de dieta estándar y posteriormente una semana de HFD
- DW-HFD: destete a la semana 4 y posteriormente una semana de HFD

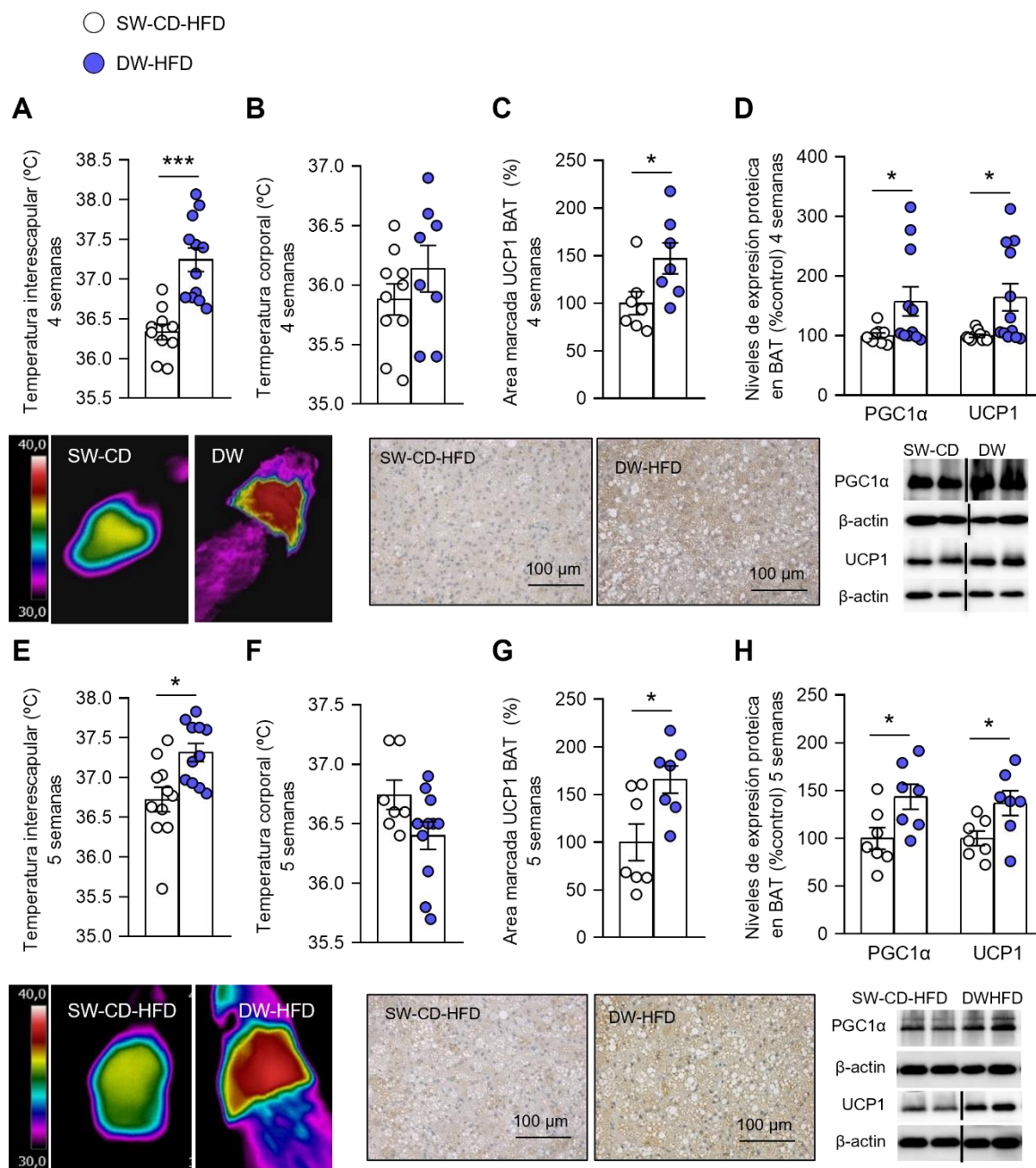
Se observó que partiendo de ratas con pesos similares a semana 3 de vida (Figura 2B), en la semana 4 continúan siendo similares en peso corporal (Figura 2C), masa grasa (Figura 2D) y magra (Figura 2E) ambos grupos. Sin embargo, a partir de la semana 5 en la cual introducimos la HFD en los dos grupos, se observa que el grupo DW-HFD ganó menos peso (Figura 2F), menos masa grasa (Figura 2G) y similar masa magra (Figura 2H) que el grupo SW-CD-HFD, todos estos efectos se observan sin cambio de ingesta de HFD (Figura 2I).



**Figura 2. Efecto de la lactancia materna a 4 semanas de edad con CD y a 5 semanas con una semana de dieta HFD en composición corporal.** Esquema del modelo animal (A), peso corporal a las 3 semanas (n=8-17) (B), peso corporal a las 4 semanas de edad (n=19) (C), masa grasa a las 4 semanas de edad (n=9) (D), masa magra a las 4 semanas de edad (n=9) (E), peso corporal a las 5 semanas de edad (n=11) (F), masa grasa a las 5 semanas de edad (n=11) (G), masa magra a las 5 semanas de edad (n=11) (H), ingesta acumulada de HFD desde la semana 4 hasta la semana 5 (n=11) (I). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Test T de *student* (B, D, F, G, I) y test de Mann-Whitney (C, E, H).

En cuanto a la actividad termogénica, observamos que las ratas DW presentan una mayor activación de la termogénesis ya desde la semana 4 como se ve en el incremento de temperatura interescapular (Figura 3A), sin cambios en la temperatura corporal (Figura 3B), mayor positividad de UCP1 en los análisis histológicos del BAT (Figura 3C), y unos mayores niveles proteicos de los marcadores termogénicos, UCP1 y PGC1 $\alpha$  (Figura 3D), estos efectos también se mantuvieron en las ratas de 5 semanas (Figura 3E-3H). Lo que nos confirma que es la

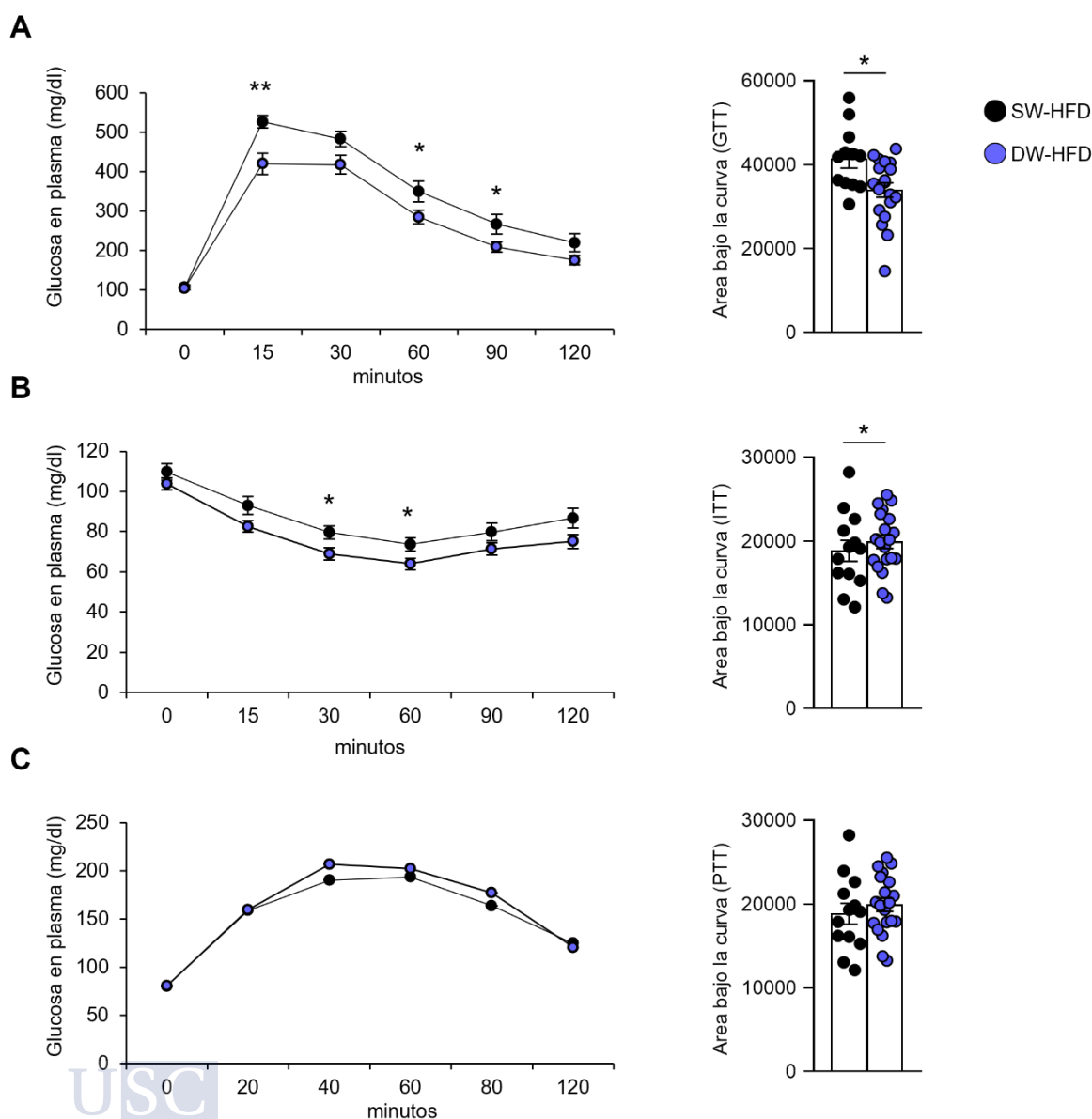
lactancia materna la responsable de la activación de la termogénesis y de la protección frente a la obesidad.



**Figura 3. Efecto de la lactancia materna a 4 semanas de edad con CD y a 5 semanas con una semana de dieta HFD en termogénesis.** Temperatura interescapular y fotografías termográficas representativas a 4 semanas (n=10-12) (A), temperatura corporal a 4 semanas (n=8-10) (B), inmunotinción de UCP1 en BAT a 4 semanas (n=7-8) (C), niveles de expresión proteica de PGC1α y UCP1 en BAT a 4 semanas (n=10-12) (D), temperatura interescapular y fotografías termográficas representativas a 5 semanas (n=11) (E), temperatura corporal a 5 semanas (n=7-11) (F), inmunotinción de UCP1 en BAT a 5 semanas (n=7) (G), niveles de expresión proteica de PGC1α y UCP1 en BAT a 5 semanas (n=7) (H). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test T de *student* (A, C, E, F, G) y test de Mann-Whitney (B, D, H).

### 1.2. LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA MEJORA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

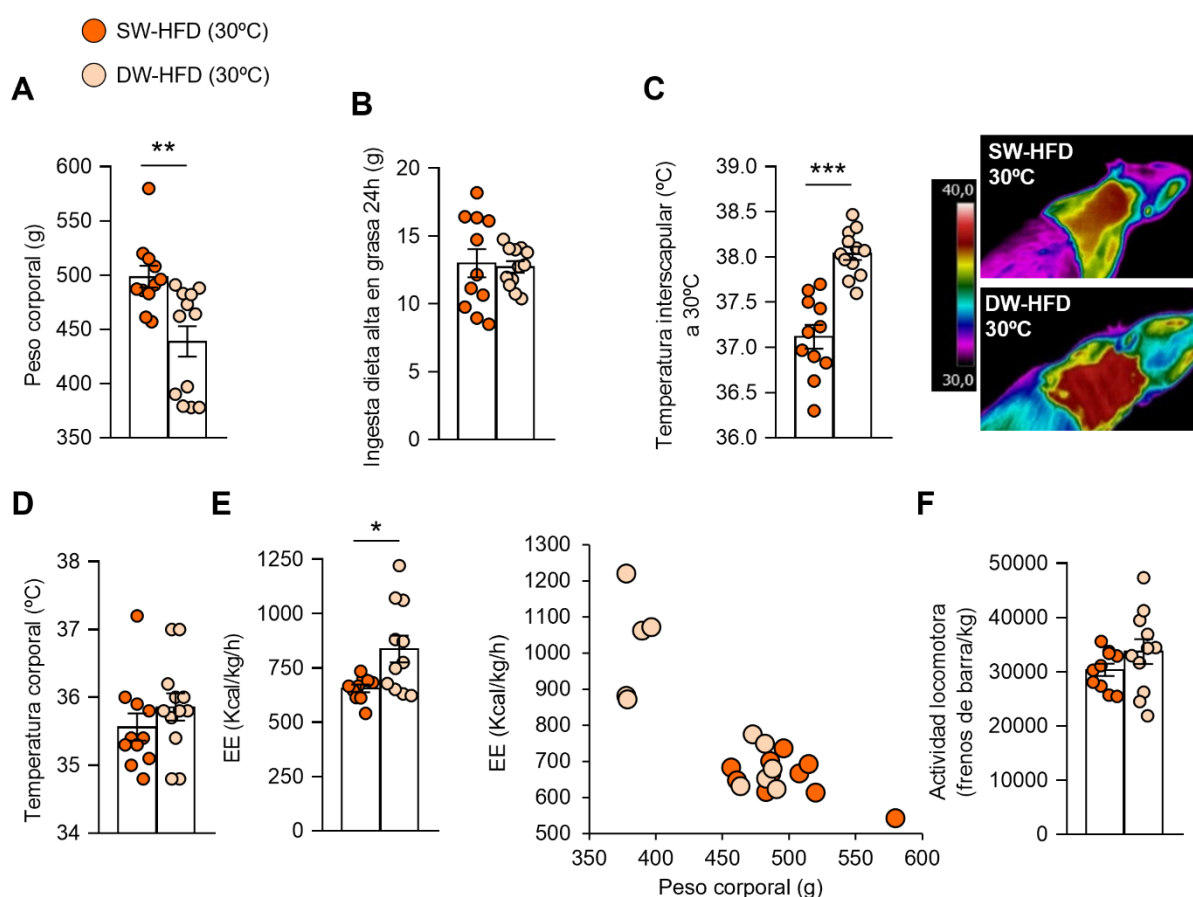
Realizamos la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) y la prueba de sensibilidad a la insulina (ITT) y al piruvato (PTT) en el modelo de DW en ratas de 18 semanas de edad alimentadas con HFD. Tras el ayuno nocturno, se administró respectivamente glucosa (2 g/kg), insulina (0,50 U/kg), piruvato (1,25 g/kg), y se realizaron medidas de glucosa en sangre con tiras reactivas a los siguientes tiempos tras la administración: 15, 30, 60, 90 y 120 min en el caso de la GTT y la ITT, 20, 40, 60, 80 y 120 min en el PTT. Las ratas DW-HFD mostraron una mejor tolerancia a la glucosa (Figura 4A) y una mayor sensibilidad a la insulina (Figura 4B) comparadas con las SW-HFD. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la PTT (Figura 4C) entre DW-HFD y SW-HFD.



**Figura 4.** GTT, ITT, PTT de ratas con DW alimentadas con HFD en la edad adulta. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) tras la inyección de glucosa y el área bajo la curva (n=12-17) (A), niveles de glucosa en sangre (mg/dL) tras la inyección de insulina y el área bajo la curva (n=13-20) (B), niveles de glucosa en sangre (mg/dL) tras la inyección de piruvato y el área bajo la curva (n=13-20) (C). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Test T de student.

**1.3. LA LACTANCIA MATERNA PROLONGADA ACTIVA LA TERMOGÉNESIS TANTO EN CONDICIONES DE TERMONEUTRALIDAD COMO EN EXPOSICIÓN A FRÍO**

A continuación, se realizó el fenotipado metabólico del modelo animal mediante calorimetría indirecta en un entorno termoneutral (30 °C), con esto se elimina el metabolismo extra necesario para mantener la temperatura corporal en condiciones ambientales más bajas. En consonancia con los resultados obtenidos previamente, observamos que el peso corporal es menor en aquellos animales DW (Figura 5A), sin variaciones en la ingesta (Figura 5B). Las ratas DW-HFD mostraron una temperatura interescapular más alta que las ratas SW-HFD (Figura 5C), mientras que la temperatura corporal fue similar entre los dos grupos (Figura 5D), lo que indica que existe una mayor actividad termogénica, incluso en condiciones de termoneutralidad. El fenotipado metabólico mostró que en condiciones de termoneutralidad el EE fue mayor en las ratas DW-HFD (Figura 5E), sin ninguna diferencia en la (Figura 5F).



**Figura 5. Efectos de DW en ratas alimentadas con HFD en la edad adulta en condiciones de termoneutralidad.** Peso corporal (n=11-12) (A), ingesta diaria de HFD (n=11-12) (B), temperatura interescapular y fotografías termográficas representativas (n=11-12) (C), temperatura corporal (n=11-12) (D), EE (n=10-11) (E), LA (n=10-11) (F). Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test T de *student* (A, B, E), ANCOVA (E) y test de Mann-Whitney (C, D, F).

Posteriormente, se realizó una prueba de exposición al frío para evaluar la respuesta termogénica del BAT en nuestro modelo animal. Durante las 6 h que los animales permanecieron sometidos a temperatura de 4 °C ratas DW-HFD conservaban mejor su temperatura interescapular (Figura 6A) y corporal (Figura 6B) comparadas con las ratas SW-HFD, además de mantener un mejor aspecto físico a lo largo del tiempo.

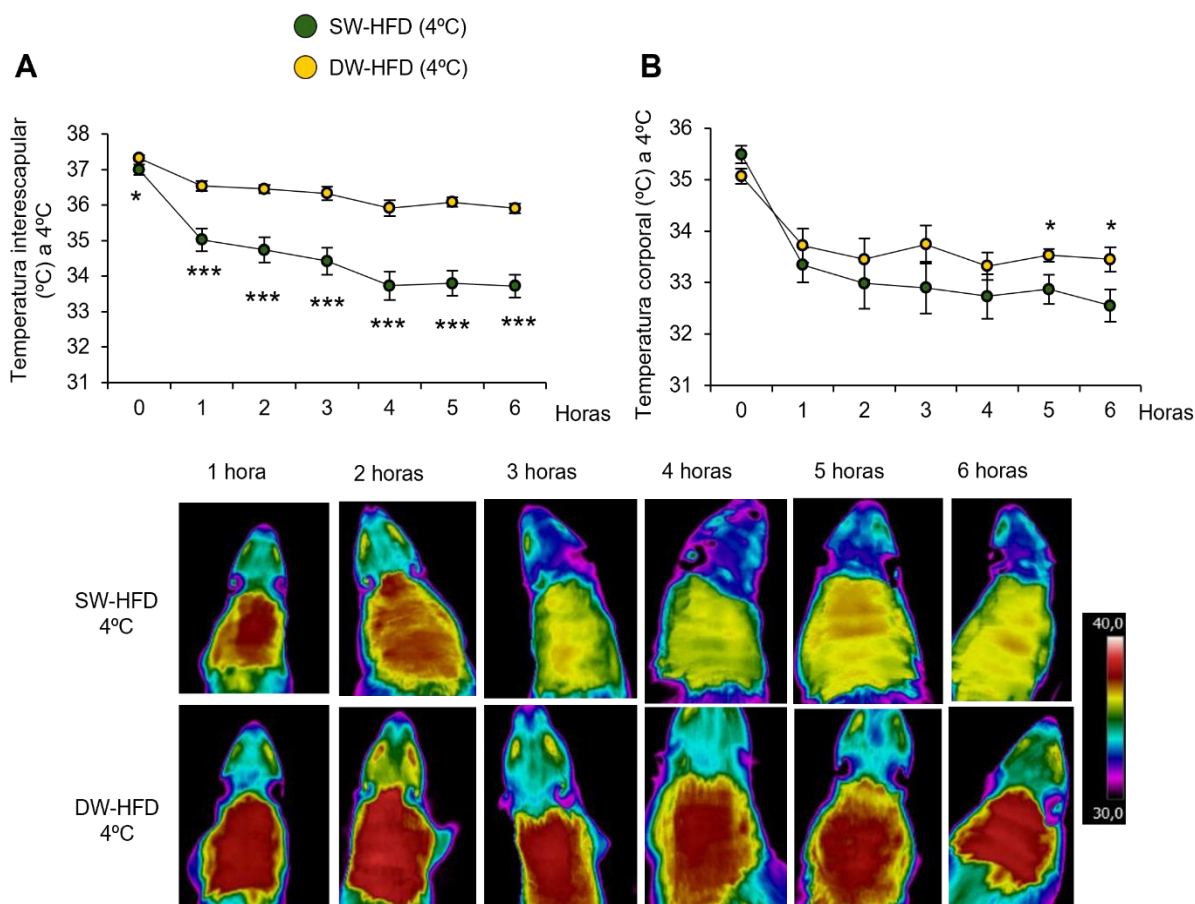


Figura 6. Test de frío de ratas con DW alimentadas con HFD en la edad adulta. Temperatura interescapular y fotografías termográficas representativas (n=10) (A), temperatura corporal (n=10) (B). Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test de Mann-Whitney.

#### 1.4. LA LACTANCIA PROLONGADA ACTIVA LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR EL BAT

Con el fin de confirmar la mayor activación del BAT por la DW, se llevó a cabo un estudio de imagen mediante la estimulación de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en BAT analizada por PET-CT en el modelo animal. Este estudio se realizó en la plataforma de imagen preclínica del CEBEGA. Se calcularon los valores de absorción (SUV), para analizar la captación de glucosa en la BAT de las ratas SW-HFD y DW-HFD.

En primer lugar, realizamos el estudio en animales sometidos ayuno nocturno (12 h de ayuno), donde pudimos observar una tendencia a la mayor captación de glucosa en ratas DW-HFD (Figura 7).

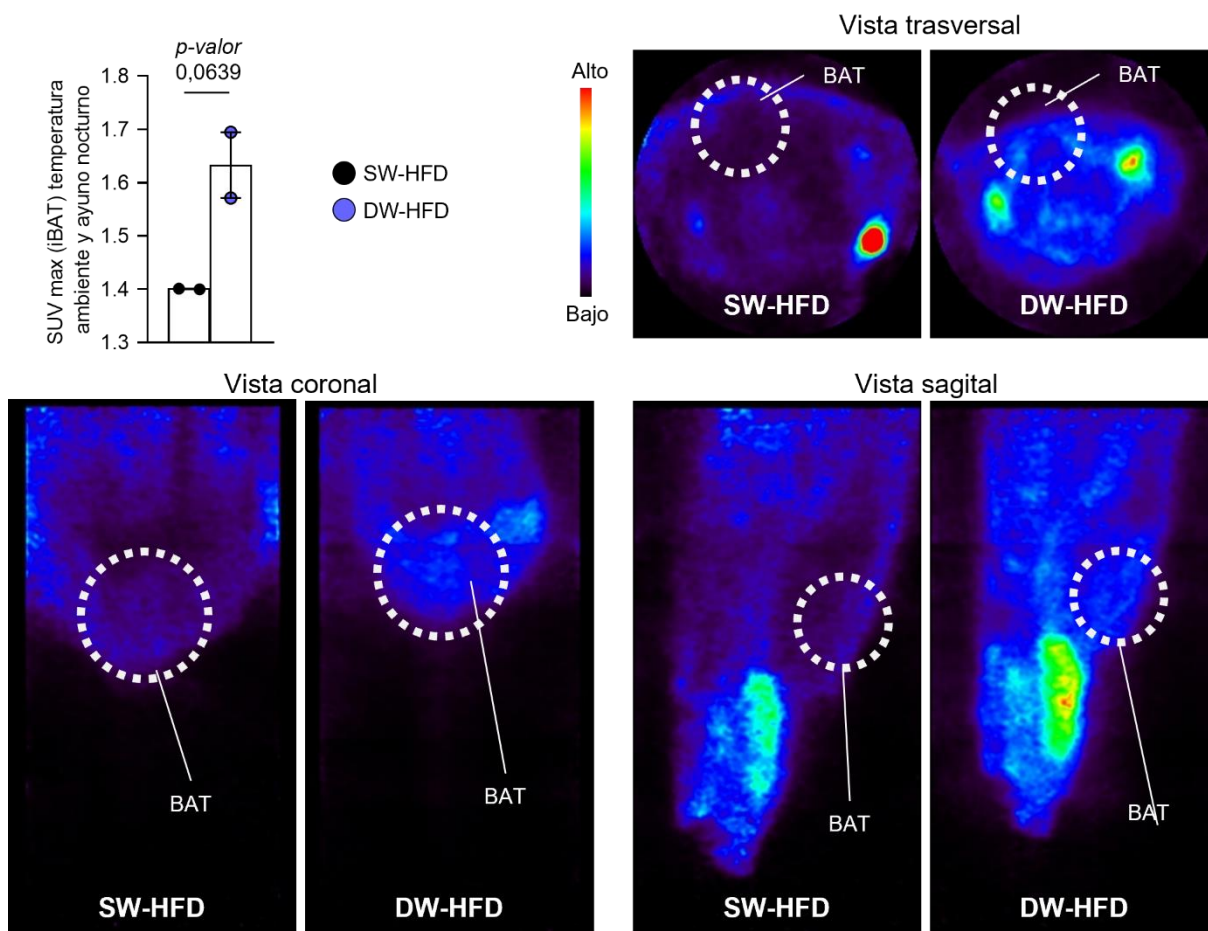


Figura 7. Análisis de absorción de  $^{18}\text{F}$ -FDG de ratas con DW alimentadas con HFD en la edad adulta. Imágenes en vista coronal, sagital y trasversal, y los niveles de absorción de  $^{18}\text{F}$ -FDG en BAT de ratas SW-HFD y DW-HFD a temperatura ambiente con ayuno nocturno (n=2). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Test T de *student*.

Puesto que los datos anteriores no mostraron resultados muy concluyentes, se realizó nuevamente el estudio manteniendo las ratas ad-libitum, ya que los experimentos previos fueron realizados en estas condiciones, pero en este caso modificando la temperatura ambiental usando como estímulo de la captación de glucosa la exposición a frío. Al analizar los datos ad-libitum a temperatura ambiente vimos un aumento significativo de la captación de glucosa (Figura 8) en el grupo DW-HFD, respecto de SW-HFD.

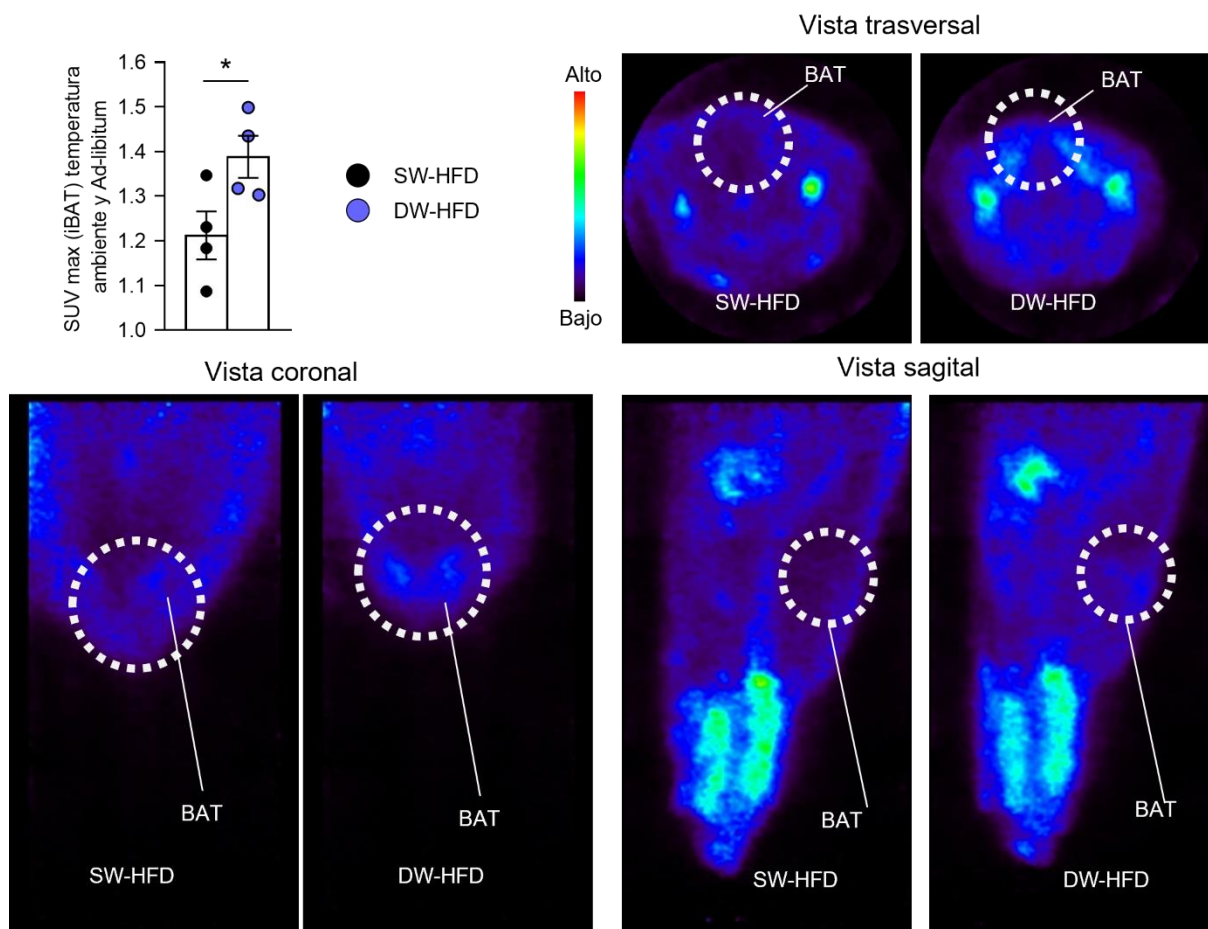


Figura 8. Análisis de absorción de  $^{18}\text{F}$ -FDG de ratas con DW alimentadas con HFD ad-libitum a temperatura ambiente en la edad adulta. Imágenes en vista coronal, sagital y trasversal y los niveles de absorción de  $^{18}\text{F}$ -FDG en BAT de ratas SW-HFD y DW-HFD a temperatura ambiente ( $n=4$ ). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ . Test T de student.

Al repetirlo con exposición al frío este incremento fue mucho más evidente, tal como se observa en las imágenes (Figura 9). Estos datos, junto con los obtenidos previamente ponen en evidencia que la activación de la termogénesis tiene un papel fundamental en la protección frente a la obesidad de la lactancia materna.

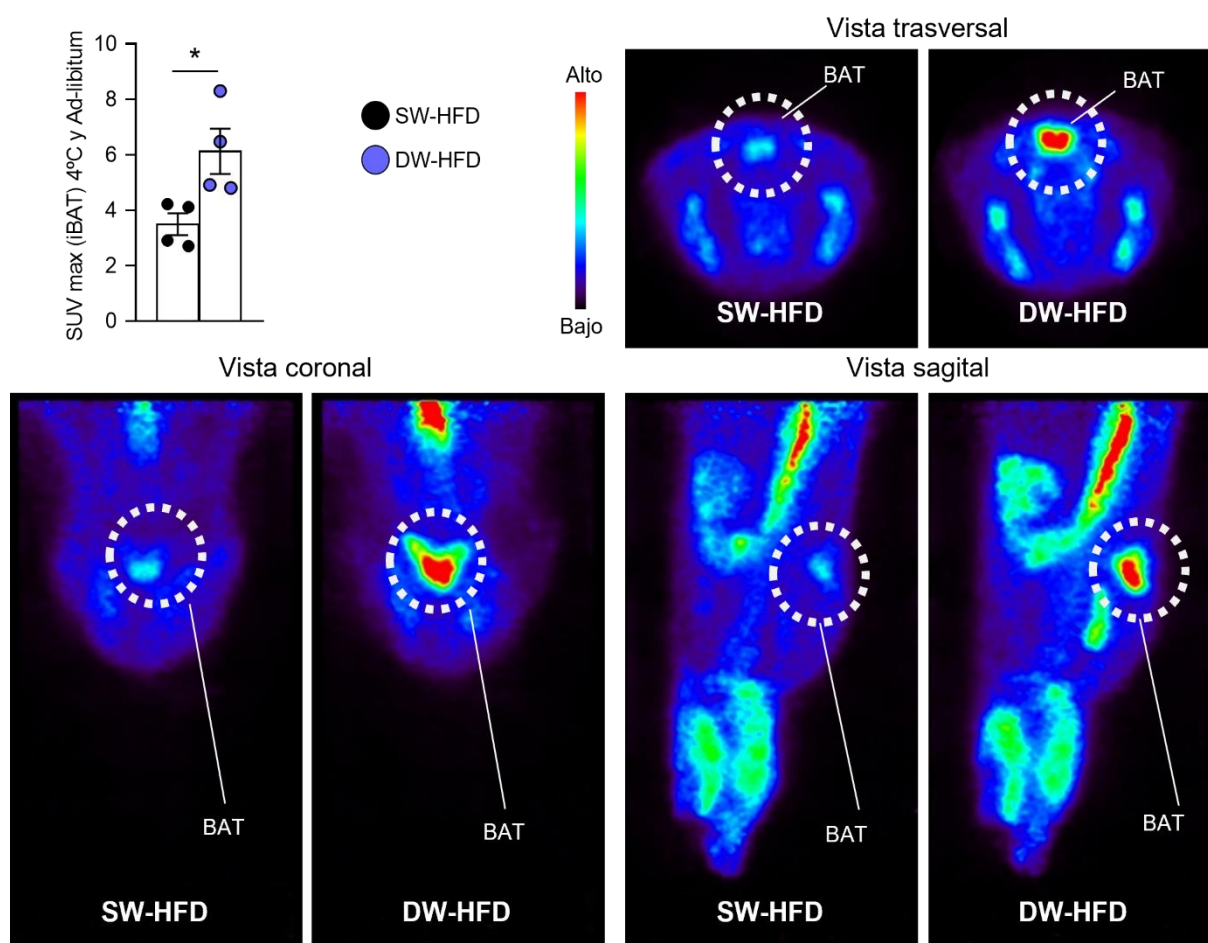
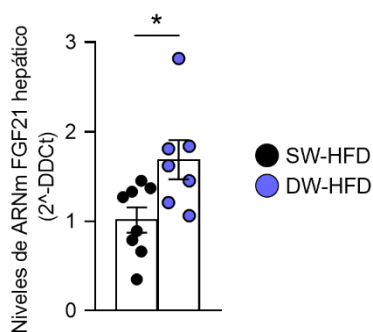


Figura 9. Análisis de absorción de  $^{18}\text{F}$ -FDG de ratas con DW alimentadas con HFD ad-libitum con exposición al frío en la edad adulta. Imágenes en vista coronal, sagital y trasversal y los niveles de absorción de  $^{18}\text{F}$ -FDG en BAT de ratas SW-HFD y DW-HFD con exposición a frío ( $n=4$ ). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ . Test T de *student*.

## 2. FGF21 CONTRIBUYE A LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA LACTANCIA MATERNA SOBRE EL METABOLISMO

### 2.1. EN RATAS CON LACTANCIA MATERNA PROLONGADA EXISTE UN INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE FGF21 HEPÁTICO

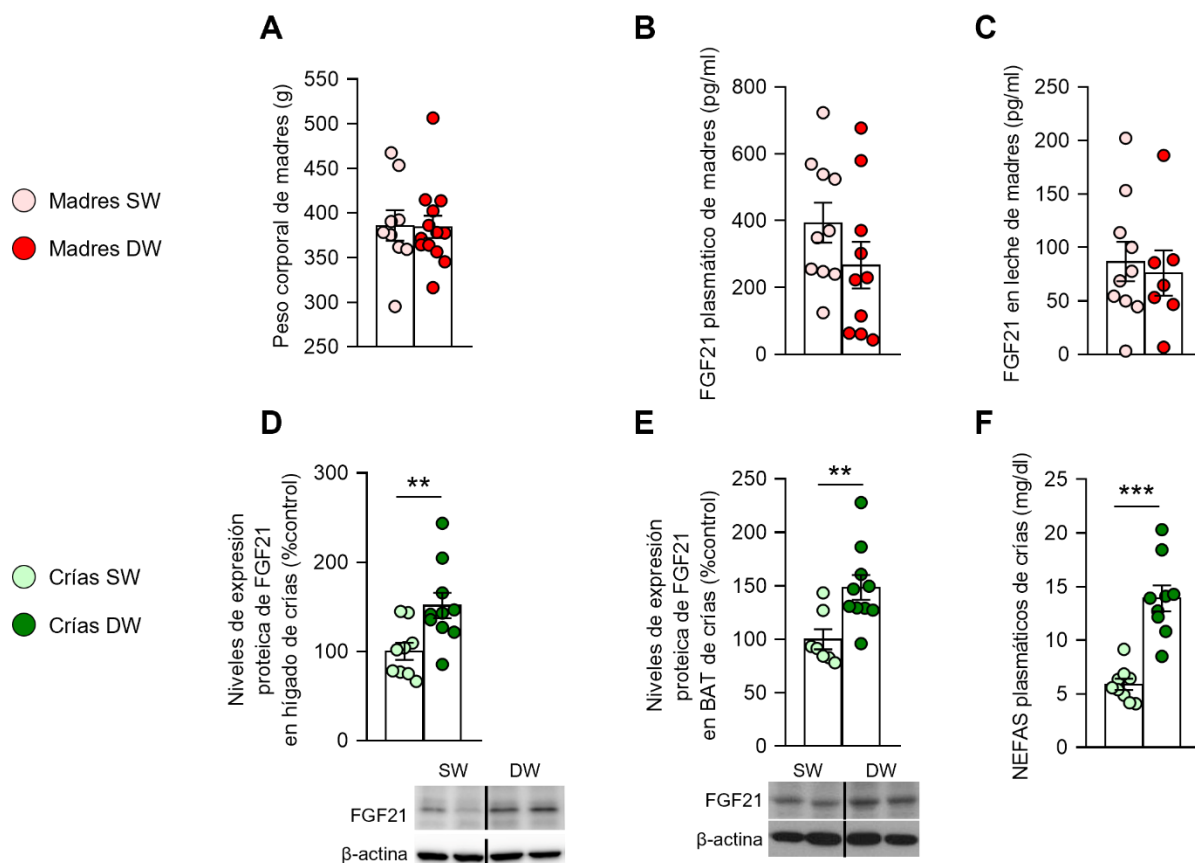
En los estudios realizados en el grupo de investigación previamente, se observó un incremento de la expresión proteica de FGF21 en hígado y de los niveles circulantes en plasma en ratas adultas DW-HFD, en comparación con ratas SW-HFD. A la vista de este dato, se decidió analizar los niveles de expresión de ARNm de FGF21 en hígado del modelo animal. Se observó que existe una mayor expresión de FGF21 en hígado en las ratas con DW (Figura 10).



**Figura 10. Niveles de ARNm de FGF21 en hígado de ratas del modelo de DW (n=7-8).** Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ . Test T de *student*.

## 2.2. LA SEMANA ADICIONAL DE LACTANCIA NO AFECTA A LOS NIVELES DE FGF21 CIRCULANTES NI EN LECHE DE LAS MADRES DEL MODELO DE LACTANCIA PROLONGADA

Con el fin de determinar si el incremento de FGF21 que se observó en los animales sometidos a DW provenía directamente de un incremento en los niveles de FGF21 de las madres durante la semana adicional de lactancia, decidimos analizar los niveles de FGF21 circulantes (en plasma) y en leche de madres que dieron de lactar 3 semanas y de madres que dieron de lactar 4 semanas. Partiendo de ratas madres de pesos similares (Figura 11A), y camadas similares, obtuvimos muestras sanguíneas de las madres al destete y analizamos FGF21 en plasma, observando que los niveles circulantes no variaron entre las madres que amamantaron a las crías 3 semanas y las que lo hicieron 4 semanas (Figura 11B). Además, tomamos muestra de leche materna, en el momento del destete donde tampoco se observó variaciones en los niveles de FGF21 entre la leche de madres que dieron lactancia durante 3 semanas frente a las que dieron 4 semanas (Figura 11C). Al analizar el hígado y BAT de las crías sacrificadas tras el destete observamos un incremento en los niveles de expresión de FGF21 hepáticos (Figura 11D), en BAT (Figura 11E), y además pudimos observar unos mayores niveles de ácidos grasos libres en plasma de crías DW (Figura 11F). Por lo tanto, todo indica que el incremento de los niveles de FGF21 en crías de DW no es una consecuencia de una mayor transferencia de FGF21 desde la madre durante la semana adicional de lactancia.

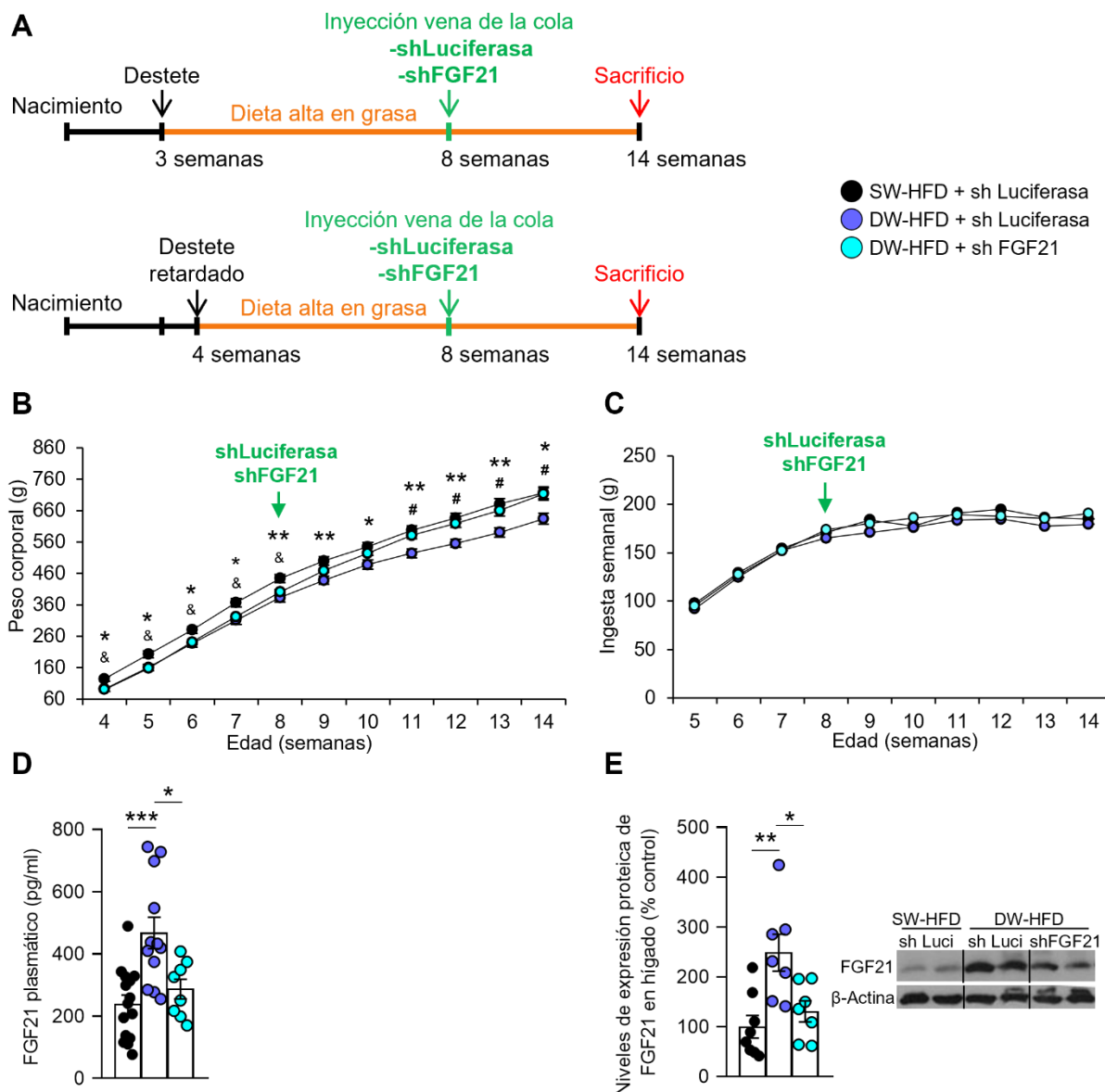


**Figura 11. Niveles de FGF21 en ratas madres y crías tras el destete del modelo de DW.** Peso corporal (n=10-15) (A), niveles circulantes de FGF21 (n=10) (B), niveles de FGF21 en leche materna (n=7-9) (C) de las madres sacrificadas tras el destete; niveles de expresión proteica en hígado (n=9-10) (D), y en BAT (n=7-10) (E), niveles de NEFAS en plasma (n=9) (F) de crías sacrificadas tras el destete. Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$ . Test T de *student*.

### 2.3. LA INHIBICIÓN DE FGF21 HEPÁTICO REVIERTE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA LACTANCIA MATERNA

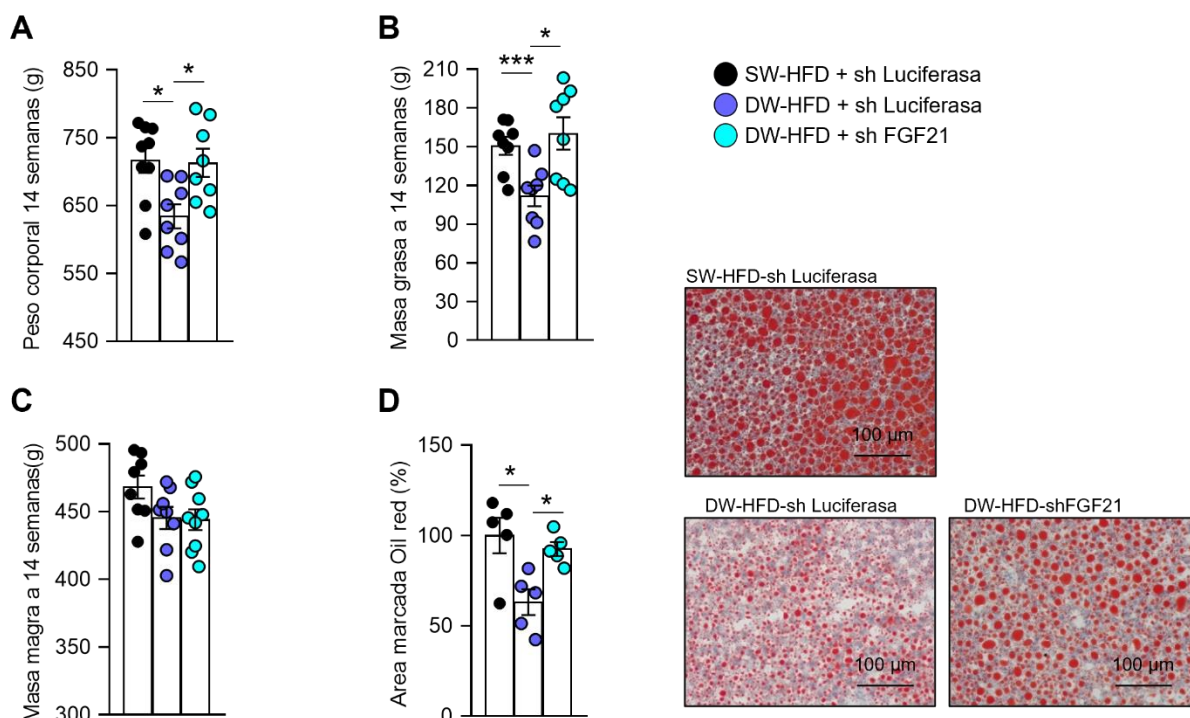
A continuación, se llevó a cabo el silenciamiento de FGF21 hepático de ratas DW-HFD. Para ello, se estableció el modelo animal con los siguientes grupos experimentales: SW-HFD, DW-HFD y un modelo adicional DW-HFD shFGF21 en el cual se realizó el silenciamiento de FGF21 con el lentivirus (shFGF21) en las ratas DW-HFD en la edad adulta (8 semanas de edad), con sus respectivos controles con shLuciferasa para los dos grupos control (Figura 12A). Previamente al silenciamiento corroboramos que el modelo mostró el fenotipo esperado con menor ganancia de peso corporal (Figura 12B), sin variación en la ingesta (Figura 12C).

Para comprobar que el silenciamiento de FGF21 hepático fue efectivo analizamos los niveles circulantes en plasma de FGF21 (Figura 12D), así como los niveles de expresión proteica de FGF21 en hígado (Figura 12E). Se encontró que efectivamente las ratas DW-HFD presentaban niveles incrementados de FGF21, y tras el silenciamiento con el shFGF21 se revertía este incremento en los niveles de FGF21 llegando a niveles muy similares a SW-HFD.



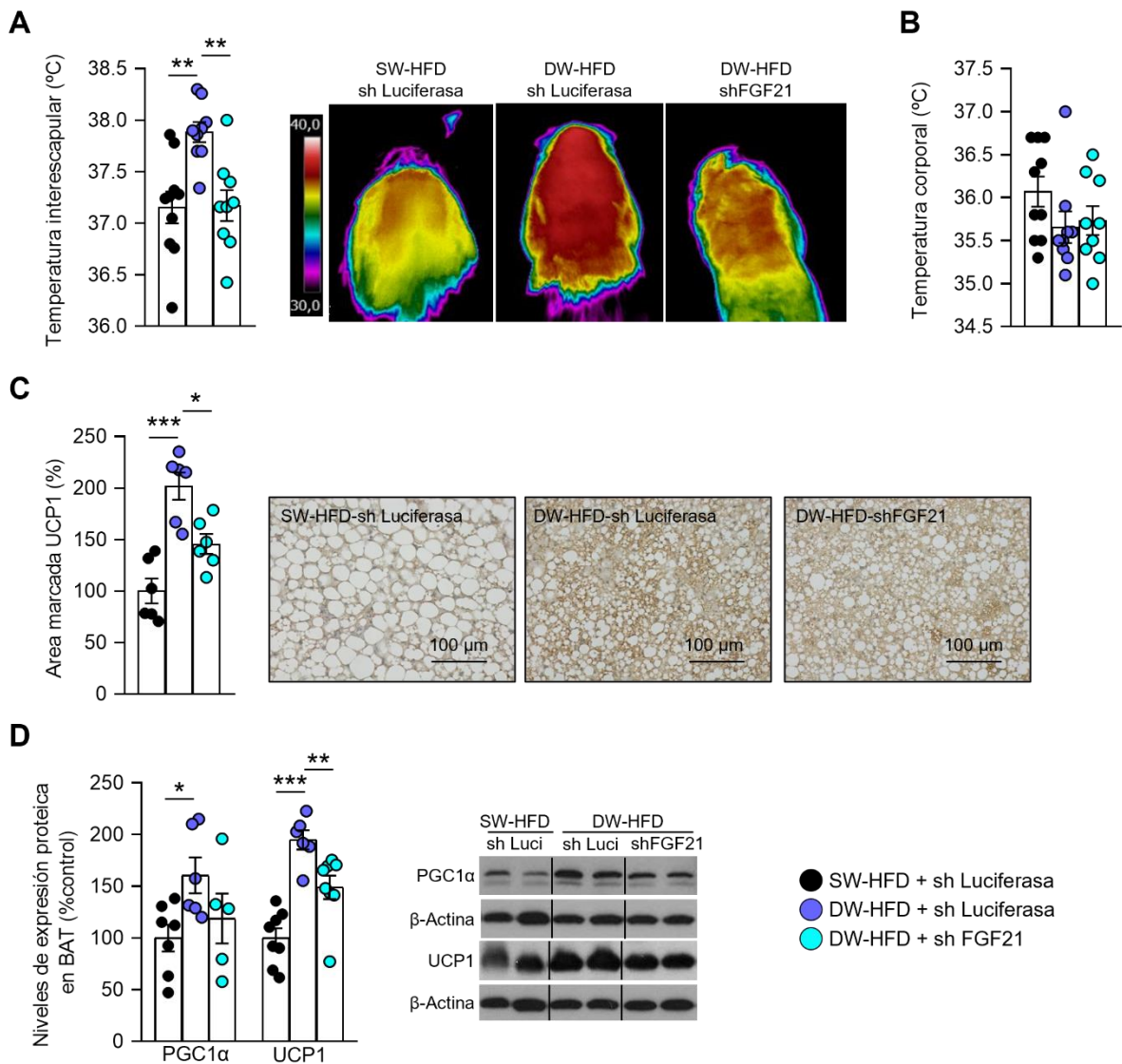
**Figura 12.** Efecto de la inhibición hepática de FGF21 en el modelo de DW sobre peso y composición corporal. Esquema del modelo animal (A), seguimiento de peso corporal desde el destete hasta 14 semanas de edad (n=8) (B), ingesta semanal acumulada hasta 14 semanas de edad (C), niveles de FGF21 plasmático (n=8-15) (D), niveles de expresión proteica de FGF21 en hígado (n=7-8) (E). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias entre grupos se indican con los siguientes símbolos: \*, SW-HFD vs DW-HFD shLuciferasa; &, SW-HFD vs DW-HFD shFGF21; #, DW-HFD shLuciferasa vs DW-HFD shFGF21. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA seguido de prueba *post-hoc* de Tukey (A-D) y test de Mann-Whitney (E)

Además, tal como esperábamos en datos *in vivo*, se observó que el grupo DW-HFD con la administración de shRNA lentiviral contra FGF21 ganaron más peso (Figura 13A) y más masa grasa (Figura 13B) que sus controles DW-HFD, presentando niveles similares de masa magra (Figura 13C), con pesos muy similares al grupo de SW. Además, en el estudio con la tinción de *Oil Red* en tejido hepático de los modelos animales se observó una menor esteatosis hepática en el grupo DW-HFD comparado con el grupo de SW, que se ve incrementada cuando inhibimos el FGF21 hepático (Figura 13D).



**Figura 13. Efecto de la inhibición hepática de FGF21 en el modelo de DW sobre peso y composición corporal.** Peso corporal a las 14 semanas (n=8) (A), masa grasa a las 14 semanas (n=8) (B), masa magra a 14 semanas de edad (n=8) (C), cuantificación de lípidos en secciones teñidas con Oil Red e imágenes representativas en secciones de hígado (n=5) (D). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias entre grupos se indican con los siguientes símbolos: \*, SW-HFD vs DW-HFD shLuciferasa; &, SW-HFD vs DW-HFD shFGF21; #, DW-HFD shLuciferasa vs DW-HFD shFGF21. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA seguido de prueba *post-hoc* de Tukey (A-D).

Con el fin de estudiar la actividad termogénica, se realizaron fotos térmicas para obtener la temperatura interescapular. Se observó que las ratas DW presentaban mayor temperatura interescapular, y que este efecto desaparecía tras el silenciamiento de FGF21 (Figura 14A), sin variar la temperatura corporal (Figura 14B). Para corroborar estos resultados se analizó por inmunotinción UCP1, el principal marcador de termogénesis en BAT, y se observó que los niveles de UCP1 se incrementaron en las ratas DW-HFD, y que dicho incremento se revirtió cuando silenciamos FGF21 hepático, hasta niveles similares a SW-HFD (Figura 14C). De forma similar observamos que los niveles proteicos de marcadores termogénicos, PGC1 $\alpha$  y UCP1, en BAT se ven disminuidos tras el silenciamiento (Figura 14D).



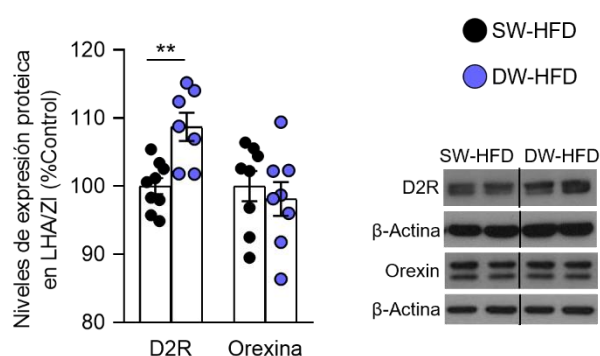
**Figura 14. Efecto de la inhibición hepática de FGF21 en el modelo de DW sobre la actividad termogénica.** Temperatura interescapular y fotos térmicas representativas (n=9-10) (A), temperatura corporal (n=9-10) (B), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=6) (C), niveles de expresión proteica de PGC1α y UCP1 en BAT (n=6-7) (D). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA seguido de prueba *post-hoc* de Tukey (A-C) y una prueba de Mann-Whitney (D).

### 3. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOTALÁMICO ESTÁ INVOLUCRADO EN LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA LACTANCIA MATERNA SOBRE EL METABOLISMO

Recientemente el grupo de investigación ha descrito un nuevo mecanismo hipotalámico que regula la termogénesis a través de la expresión del receptor dopaminérgico D2R específicamente en LHA/ZI, pero no en otras regiones hipotalámicas [101]. Dado que tal como hemos demostrado hasta el momento, el modelo de DW presenta una activación de la termogénesis en BAT, se estudió si este mecanismo pudiese estar implicado en los efectos metabólicos de la DW.

#### 3.1. EN RATAS CON LACTANCIA MATERNA PROLONGADA EXISTE UN INCREMENTO DE D2R EN LHA/ZI

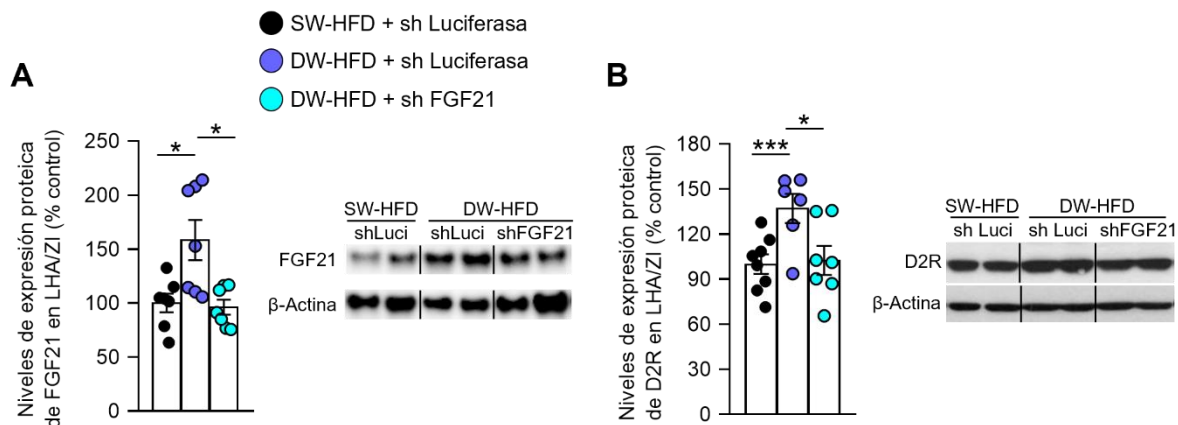
En primer lugar, se determinaron los niveles del receptor D2R en el LHA/ZI del modelo animal de DW. Mediante western blot se analizaron los niveles proteicos de D2R en LHA/ZI observando que el receptor D2R estaba incrementado en aquellos animales que tuvieron una semana más de lactancia materna. Como control de la zona hipotalámica utilizada medimos los niveles de OX ya que esta se produce selectivamente en esta área hipotalámica (Figura 15).



**Figura 15. Efecto de la lactancia prolongada sobre la expresión proteica en el LHA/ZI.** Niveles de expresión del receptor D2R (n=8-9) y OX (n=7-8) en LHA/ZI. Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*\*  $p < 0,01$ . Prueba Mann-Whitney.

#### 3.2. LOS NIVELES ELEVADOS DE FGF21 QUE SE PRODUCEN CON LA LACTANCIA PROLONGADA CONTRIBUYEN A LA ACTIVACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS POR EL BAT A TRAVÉS DE SU ACCIÓN SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOTALÁMICO.

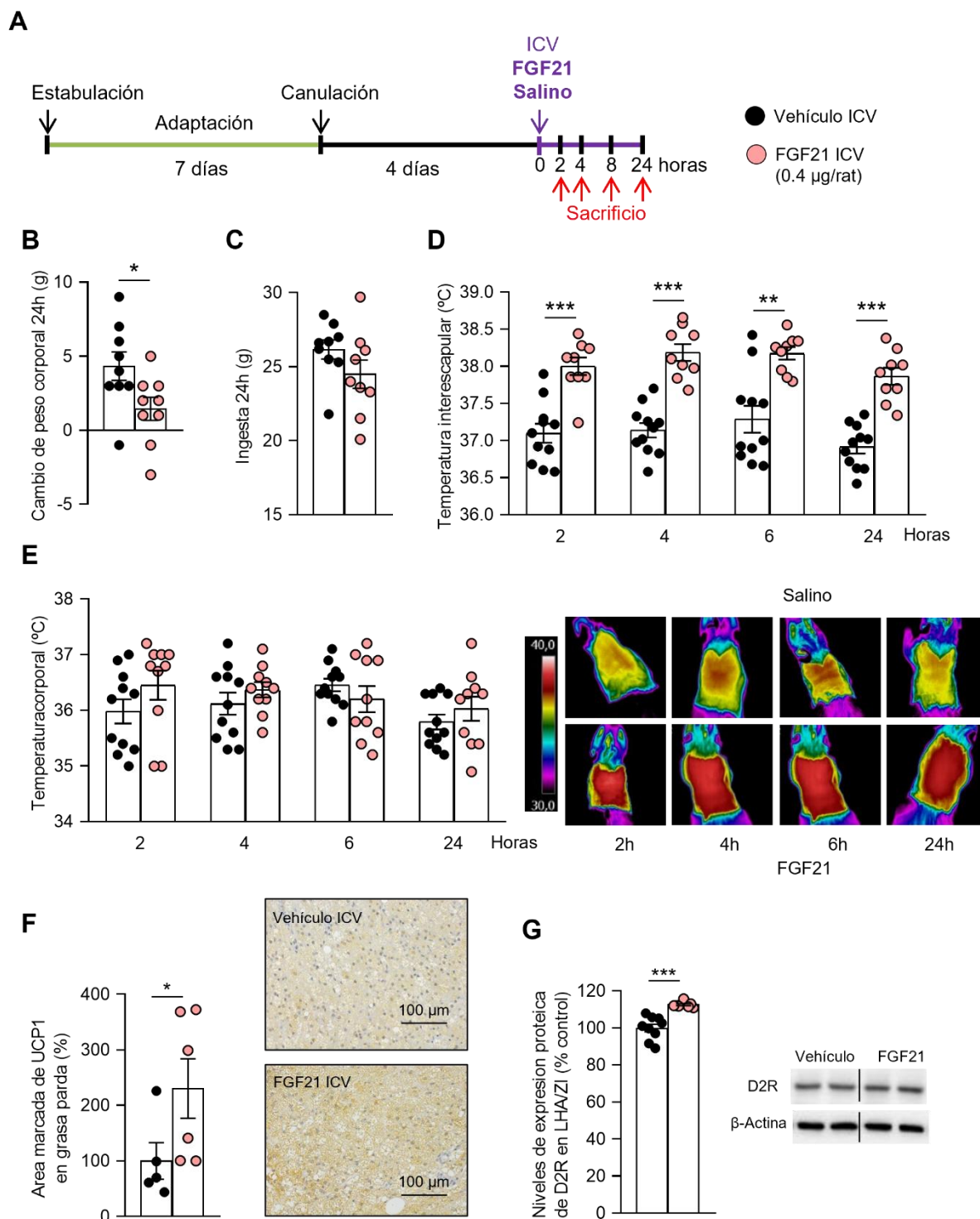
Con el fin de conocer si los efectos protectores de la DW estaban mediados por la interacción entre FGF21 y el sistema dopaminérgico hipotalámico se analizó la expresión de FGF21 y D2R en el LHA/ZI del modelo animal con la inhibición hepática de FGF21. Se observó que las ratas DW-HFD mostraron un aumento de los niveles de FGF21 en el LHA/ZI en comparación con los animales con SW-HFD, que se redujo cuando se bloqueó la producción de FGF21 hepático utilizando el vector lentiviral shFGF21 (Figura 16A). Los niveles de D2R aumentaron en el LHA/ZI de los animales con DW-HFD en comparación con los de SW-HFD y se redujeron de nuevo cuando se bloqueó la producción de FGF21 hepático (Figura 16B). En general, estos resultados apoyan la hipótesis de que la sobreproducción de FGF21 durante la DW llega a los circuitos dopaminérgicos hipotalámicos para mediar en el aumento de la termogénesis del BAT.



**Figura 16. Efecto de la inhibición hepática de FGF21 en el modelo de DW en la expresión proteica de FGF21 y D2R en el LHA/ZI.** Niveles de expresión proteica de FGF21 (A), y de D2R (B) en LHA/ZI. Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test de Mann-Whitney.

### 3.3. LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE FGF21 REPRODUCE LOS EFECTOS DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA E INDUCE UN AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE D2R EN EL LHA/ZI

Se llevó a cabo la administración central de FGF21 en ratas con SW y CD, para analizar la expresión de D2R en el LHA/ZI. Se administró FGF21 ICV a una dosis de 0,4  $\mu$ g/rata, mientras que al grupo control se les administró solución salina (Figura 17A). Realizamos un seguimiento y observamos que la administración ICV de FGF21 redujo el peso corporal después de 24 h (Figuras 17B), un efecto que fue independiente de la ingesta de alimentos (Figura 17C). La administración de FGF21 también indujo un aumento sostenido de la temperatura interescapular tras 2 h desde su administración hasta al menos 24 h (Figura 17D), sin variaciones en la temperatura corporal (Figura 17E), lo que indica un aumento de la termogénesis del BAT. En consecuencia, los niveles de UCP1 aumentaron en el BAT de las ratas a las que se administró FGF21 ICV (Figura 17F). Posteriormente, tras el sacrificio se analizó la expresión del D2R en el LHA/ZI y se observó que el FGF21 condujo a un aumento de expresión de D2R (Figura 17G), de la misma forma que ocurre en el modelo de DW. Por tanto, la administración central de FGF21 a ratas con SW reprodujo los efectos beneficiosos de la DW sobre el metabolismo.

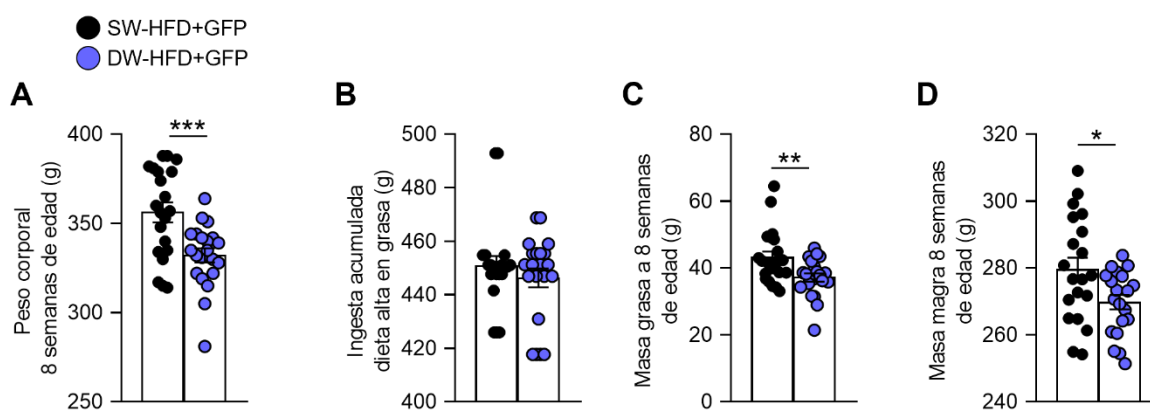


**Figura 17. Efecto de la administración de FGF21 ICV en ratas estándar con CD.** Esquema del modelo animal (A), cambio de peso en 24 h (n=9-11) (B), ingesta en 24 h (C), temperatura interescapular y fotos térmicas representativas (n=9-11) (D), temperatura corporal (n=9-11) (E), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=6) (F), niveles de expresión proteica de D2R en LHA/ZI (G). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test T de *student* (B, C, D, E) y test de Mann-Whitney (F, G).

### 3.4. LA INHIBICIÓN DEL D2R EN EL LHA/ZI BLOQUEA LOS EFECTOS PROTECTORES DE LACTANCIA MATERNA PROLONGADA

Dada la observación de que la expresión de D2R en el LHA/ZI se encuentra elevada en los animales con DW-HFD, además del incremento en los niveles de este receptor que se producen tras la administración ICV de FGF21, quisimos comprobar si este aumento de D2R en el LHA/ZI estaba implicado en el efecto protector de la DW frente al aumento de peso inducido por la HFD.

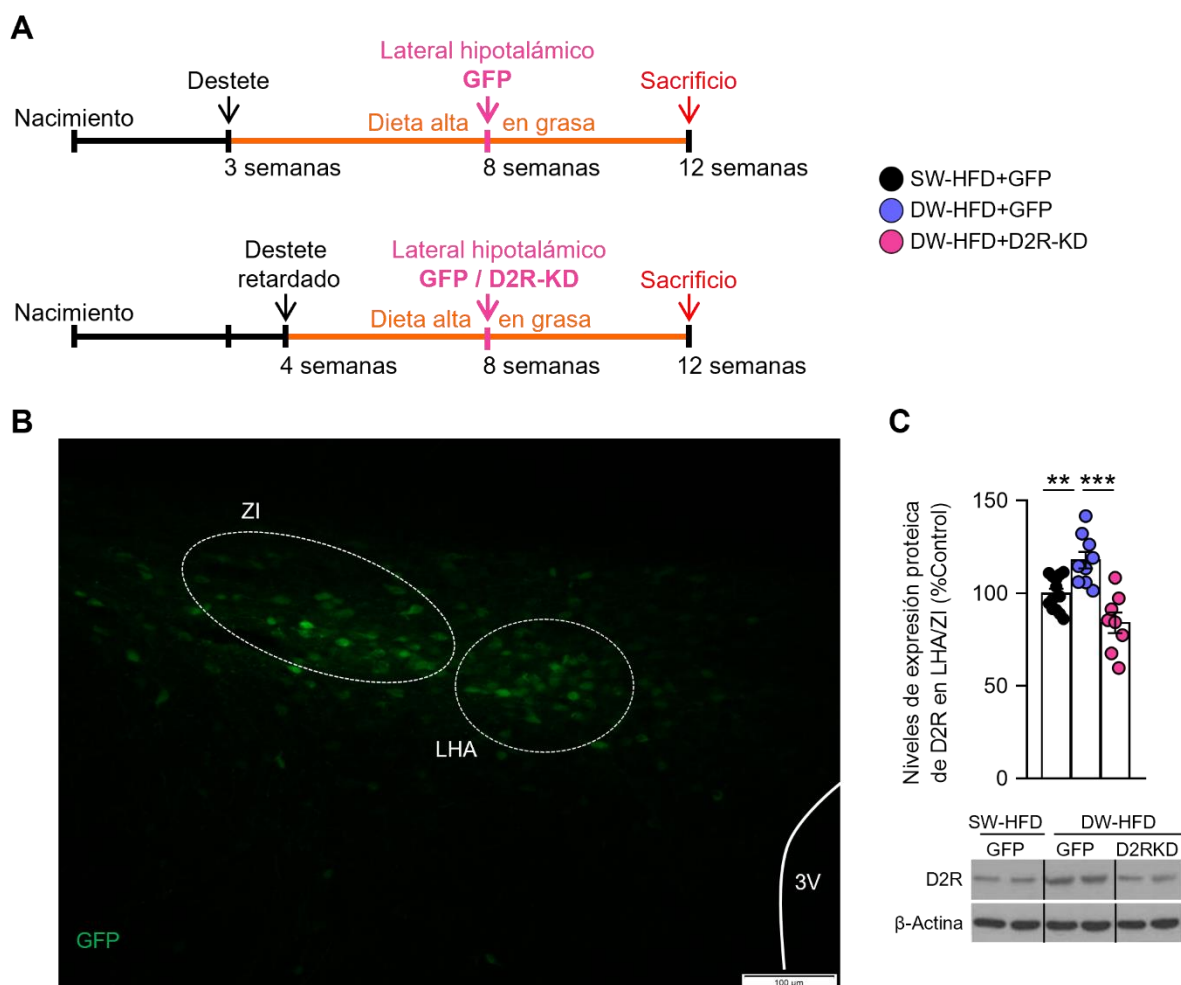
Con este fin, se estableció, de nuevo, el modelo DW-HFD, tal como esperábamos las ratas DW-HFD ganaban menos peso que las SW-HFD (Figura 18A), sin cambios en ingesta (Figura 18B). Además, se observó una menor masa grasa (Figura 18C) y magra (Figura 18D) en las ratas DW-HFD con respecto a las SW-HFD.



**Figura 18. Modelo de DW.** Peso corporal (n=21) (A), ingesta acumulada (n=21) (B), masa grasa (n=21) (C), masa magra (n=21) (D) a las 8 semanas de edad. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Prueba T de *student* (A, C) y prueba Mann-Whitney (B, D).

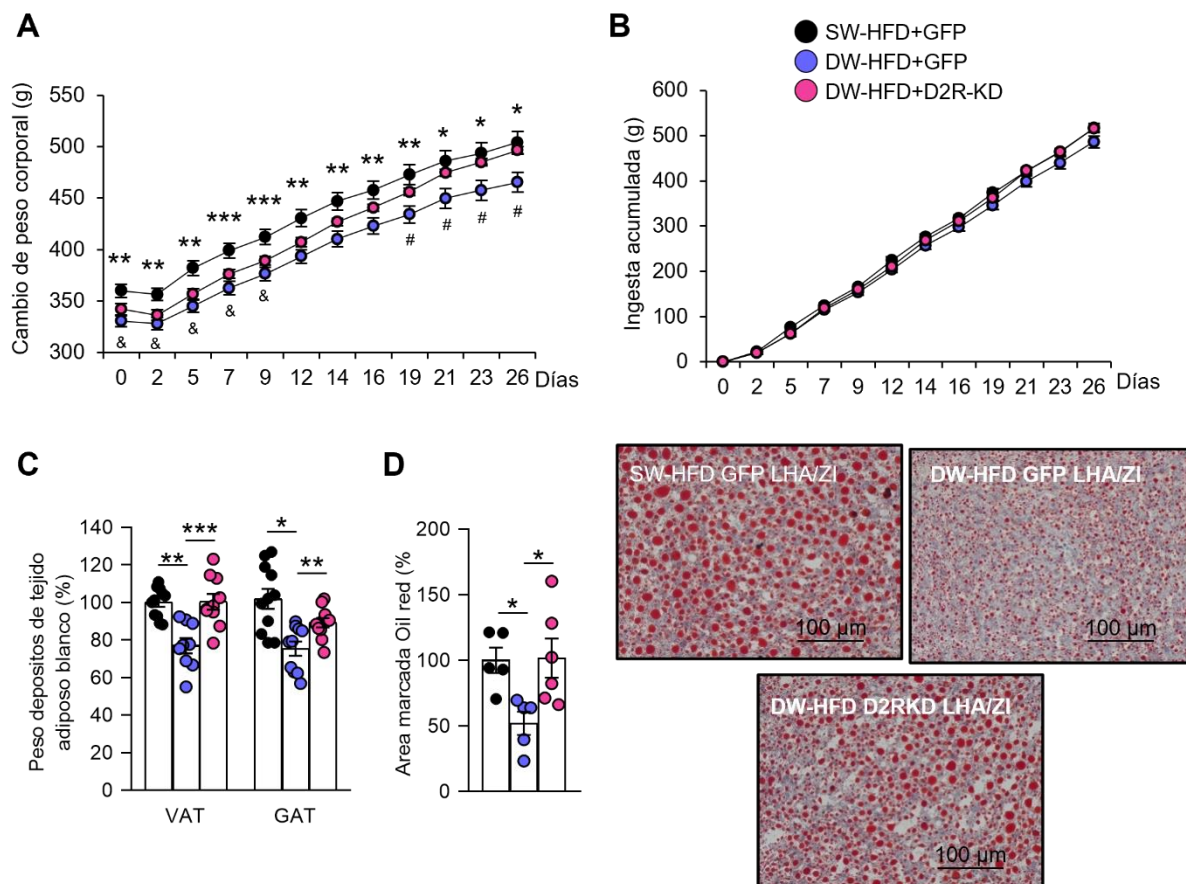
Posteriormente se silenció la expresión de D2R inyectando de manera núcleo-específica un vector adenoviral que codificaba un ARN contra D2R (D2R-KD) o una secuencia codificada de GFP en el LHA/ZI de ratas DW-HFD (Figura 19A).

En el grupo de animales DW-HFD se silenció la expresión de D2R comprobándose la eficiencia de la administración núcleo-específica mediante inmunohistoquímica la cual mostró la positividad del virus control que sobreexpresa GFP específicamente en LHA/ZI (Figura 19B). Además, mediante western blot, se demostró la eficiencia en el silenciamiento del D2R por el adenovirus en el LHA/ZI mostrando una disminución importante en la expresión de D2R en esta zona hipotalámica en los animales DW-HFD inyectados con el adenovirus con respecto a los DW-HFD inyectados con el vehículo (Figura 19C).



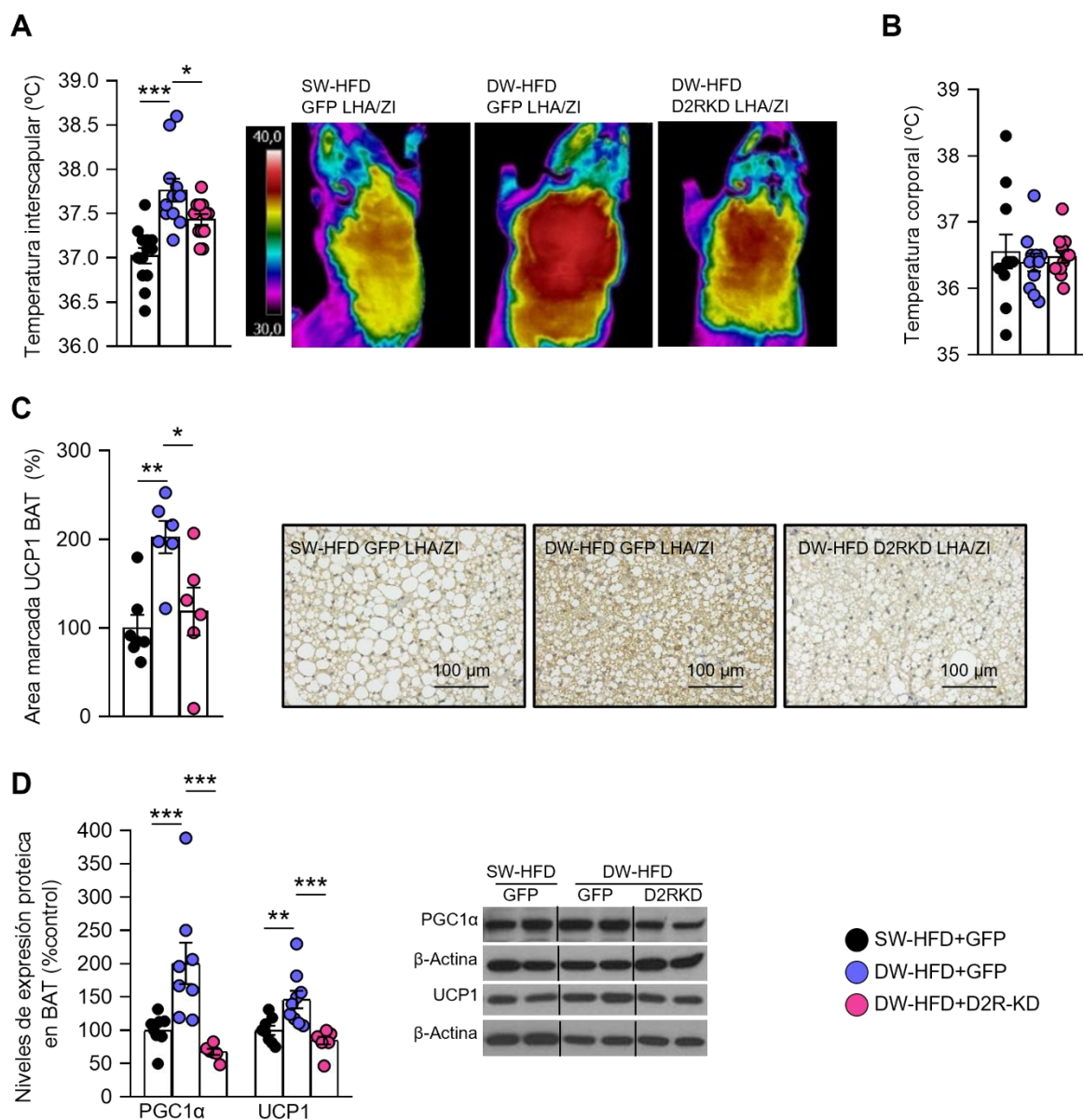
**Figura 19. Efecto del bloqueo de D2R en LHA/ZI en el modelo de DW.** Esquema del modelo animal (A), fotomicrografía representativa de la sección cerebral que muestra la inyección de los vectores virales que codifican la expresión de GFP colocados con precisión en el LHA/ZI, barra de escala 0,1 mm (B), niveles de expresión proteica de D2R en LHA/ZI (n=8-11) (C). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test Mann-Whitney (C).

La inhibición del D2R en el LHA/ZI, en ratas DW-HFD bloqueó el efecto protector de la lactancia materna como se muestra en la ganancia de peso corporal (Figura 20A) que es equivalente a la observada en SW-HFD, sin variación en la ingesta de alimentos (Figura 20B). De la misma manera, se observaron niveles similares de adiposidad (Figura 20C) y esteatosis hepática, mostrada en la tinción Oil-red de hígado (Figura 20D) entre el grupo DW-HFD con el D2R-KD y SW-HFD.



**Figura 20. Efecto del bloqueo de D2R en LHA/ZI en el modelo de DW.** Cambio de peso corporal (n=9-11) (A), ingesta acumulada de HFD (n=9-11) (B), peso del VAT visceral (VAT) y gonadal (GAT) entre peso corporal (n=9-11) (C), área de la tinción Oil-red de hígado e imágenes representativas (n=5-6) (D). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias entre grupos se indican con los siguientes símbolos: \*, SW-HFD GFP vs DW-HFD GFP; &, SW-HFD GFP vs DW-HFD D2R-KD; #, DW-HFD GFP vs DW-HFD D2R-KD. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA seguido de prueba *post-hoc* de Tukey (A-D).

En consonancia con estos cambios, la activación termogénica en respuesta a la DW fue atenuada por el silenciamiento del D2R en el LHA/ZI, así podemos observar que el incremento de temperatura interescapular se revierte (Figura 21A), sin cambios en temperatura corporal (Figura 21B). De la misma manera la tinción de UCP1 en el BAT (Figura 21C) y los niveles de proteína de UCP1 y PGC1 $\alpha$  (Figura 21D) también se vieron disminuidos tras la administración del adenovirus. Estos resultados indican que el D2R en la LHA/ZI media el papel protector de la DW frente al desarrollo de DIO.

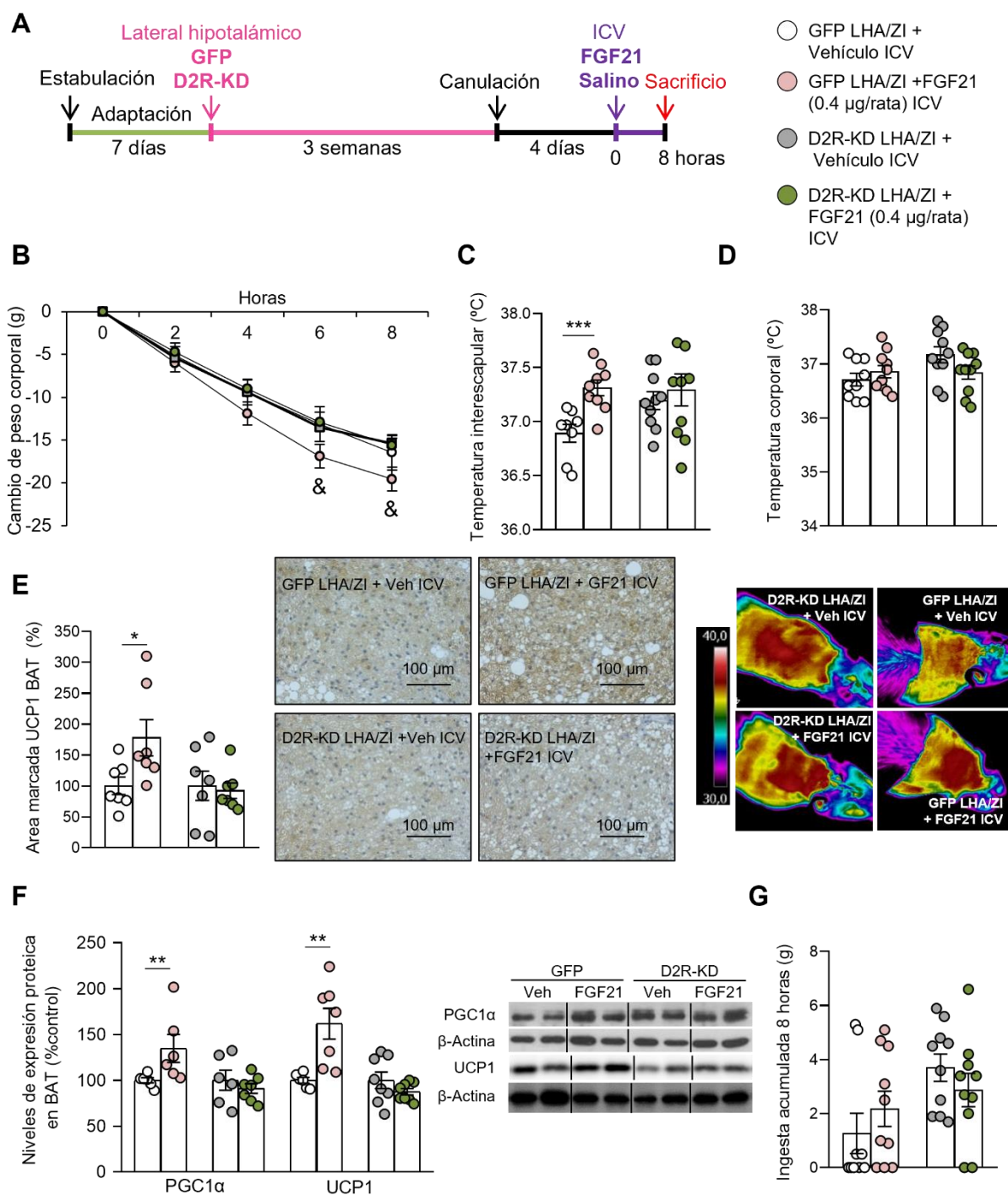


**Figura 21. Efecto del bloqueo de D2R en LHA/ZI en el modelo de DW sobre la termogénesis.** Temperatura interscapular y fotos térmicas representativas (n=11-13) (A), temperatura corporal (n=11-13) (B), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=6-7) (C), niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1α en BAT (n=8-9) (D). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA seguido de prueba *post-hoc* de Tukey (A, B, C) y prueba de Mann-Whitney (D).

### **3.5. LA ACTIVACIÓN DE D2R EN LHA/ZI INDUCIDA POR FGF21 ES NECESARIA PARA LAS ACCIONES BIOLÓGICAS DE FGF21 SOBRE LA TERMOGÉNESIS**

A continuación, investigamos si la activación de la expresión de D2R inducida por FGF21 era necesaria para las acciones biológicas de FGF21. Para probar esta hipótesis, usamos el mismo adenovirus asociado utilizado previamente con el modelo DW-HFD, que codifica el D2R-KD o su control GFP, se inyectó estereotáxicamente en el LHA/ZI de ratas estándar (SW y CD) a las que posteriormente se les administró FGF21 ICV en la misma dosis utilizada previamente (0,4µg/rata) (Figura 22A).

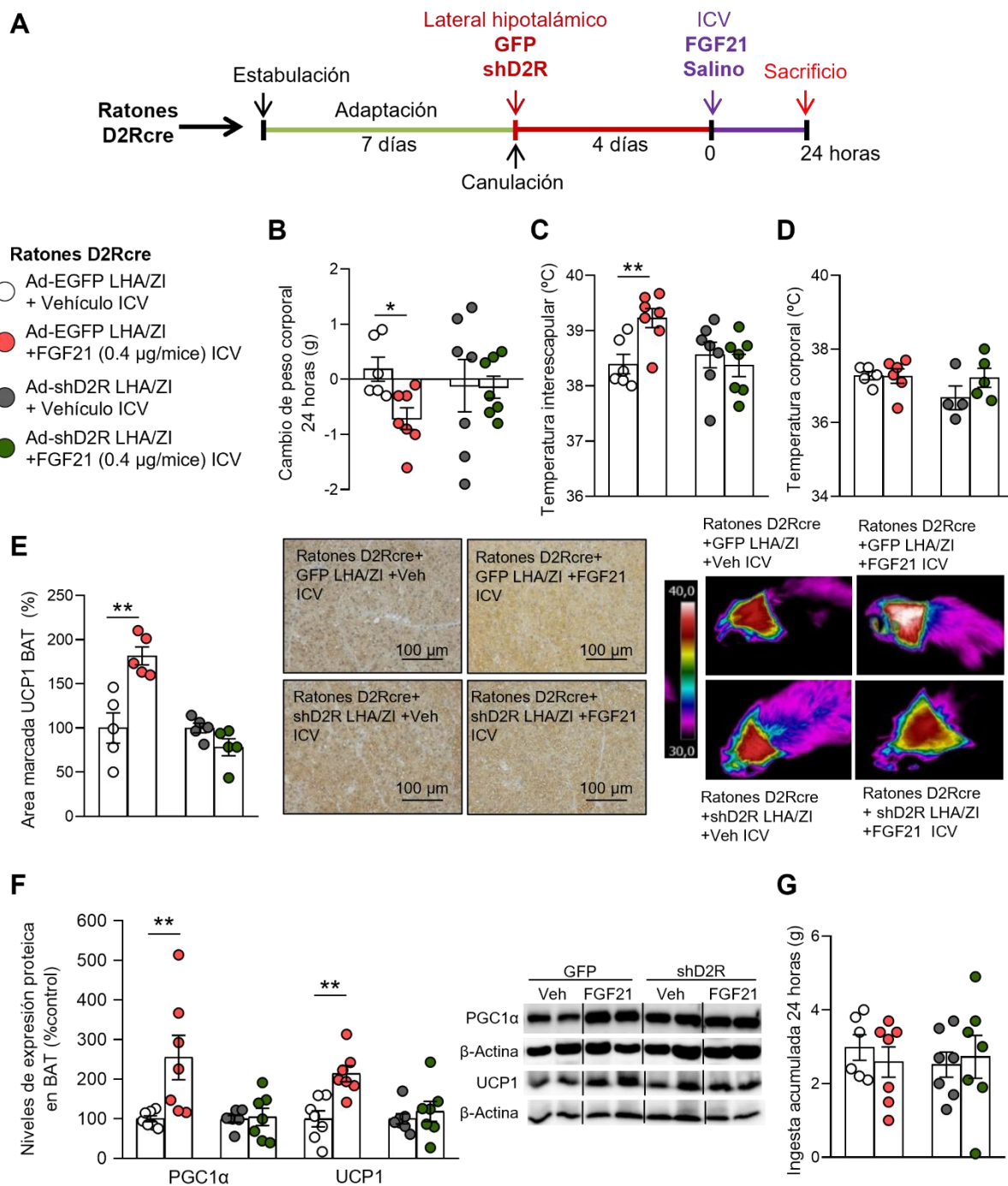
Tal y como describimos hasta el momento la administración de FGF21 induce la activación de la termogénesis, con la consiguiente pérdida de peso en el grupo control GFP con FGF21 (Figura 22B), con incremento de temperatura interescapular (Figura 22C) sin modificar la temperatura corporal (Figura 22D), con mayores niveles de UCP1 en BAT (Figura 22E), así como mayores niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1 $\alpha$  (Figura 22F), sin cambios en ingesta (Figura 22G). Sin embargo, al analizar estos parámetros en los animales que presentan el bloqueo en la expresión de D2R en el LHA/ZI se observó que no se produce este incremento en la actividad termogénica, mediada por FGF21. Así, se observa que en los animales inyectados con el adenovirus para silenciar D2R no se produce la disminución del peso corporal, ni tampoco el incremento en temperatura interescapular ni en los niveles de UCP1 ni PGC1 $\alpha$  (Figura 22B-22G) esperado en respuesta a la administración central de FGF21. Estos datos indican que efectivamente la activación de D2R en LHA/ZI es necesaria para que FGF21 pueda llevar a cabo sus acciones biológicas.



**Figura 22. Efecto del bloqueo de D2R en LHA/ZI en ratas estándar con administración de FGF21 ICV.** Esquema del modelo animal (A), cambio de peso corporal (n=9-10) (B), temperatura interescapular y fotos térmicas representativas (n=8-10) (C), temperatura corporal (n=9-10) (D), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=7) (E), niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1α en BAT (n=6-8) (F), ingesta acumulada (n=9-10) (G). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias entre grupos se indican con los siguientes símbolos: &, GFP vehículo vs GFP FGF21 ICV. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test T de student (B-E, G) y test de Mann-Whitney (F).

Para confirmar el papel del D2R del LHA/ZI mediando la acción del FGF21, utilizamos ratones D2R-Cre en el que se inyectaron en el LHA/ZI con un AAV dependiente de Cre que codificaba un ARN para GFP (Ad-hSyn-DIO-EGFP) en los controles o un ARN contra el D2R (Ad-hSyn-DIO-shD2R-EGFP). Al igual que en el experimento anterior administramos FGF21 a una dosis de 0,4µg/ratón o salino ICV (Figura 23A).

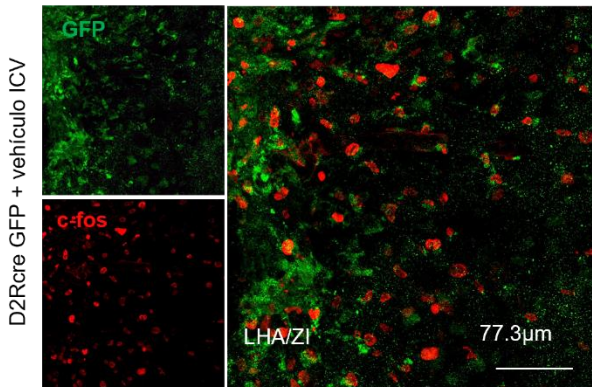
Al igual que en el apartado anterior, en los ratones control se observó la disminución del peso corporal inducida por FGF21, así como el incremento de la termogénesis (Figura 23B-23G). Sin embargo, en aquellos animales que presentaban el D2R silenciado en LHA/ZI no se observó este efecto sobre el peso corporal (Figura 23B), ni la correspondiente activación de la termogénesis por FGF21 como se ve en los datos de temperatura interescapular (Figura 23C) marcaje de UCP1 (Figura 23E) y niveles de proteína PGC1 $\alpha$  y UCP1 en el BAT (Figura 23F). Todo ello sin cambios en temperatura corporal (Figura 23D), ni en ingesta (Figura 23G).



**Figura 23. Efecto del bloqueo de D2R en LHA/ZI en ratones 2R-cre con administración de FGF21 ICV.** Esquema del modelo animal (A), cambio de peso corporal (n=6-7) (B), temperatura interescapular y fotos térmica representativas (6-7) (C), temperatura corporal (n=5-6) (D), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=5) (E), niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1α en BAT (n=7) (F), ingesta acumulada (G). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,005$ , \*\*  $p < 0,01$ . Test T de *student* (B-E, G) y test de Mann-Whitney (F).

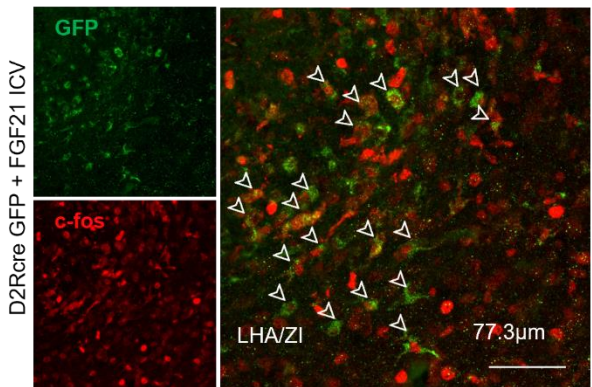
Además de los parámetros mencionados, analizamos la expresión de C-Fos en las neuronas D2R de LHA/ZI, con el fin de comprobar si existe activación de estas neuronas tras el tratamiento con FGF21. Se observó una clara activación de C-Fos en las neuronas D2R de LHA/ZI tras el tratamiento con FGF21 (Figura 24B) a comparación de las que fueron tratadas con salino (Figura 24A). Sin embargo, esta activación disminuyó de manera importante en la población neuronal de LHA/ZI que carecía específicamente de D2R (Figura 24C).

**A**

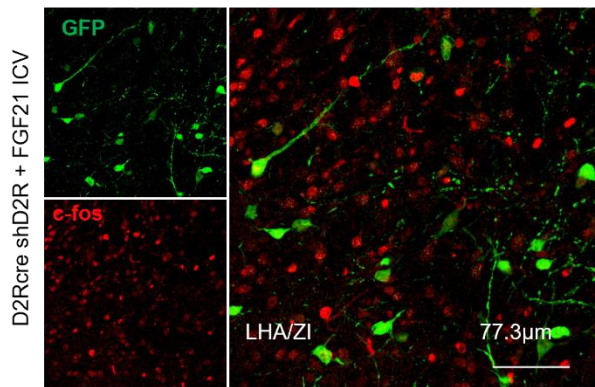


**Figura 24. Efecto del bloqueo de D2R en LHA/ZI en ratones D2R-cre con administración de FGF21 ICV.** Microfotografía que muestra la colocalización de GFP y c-fos en LHA/ZI de ratones D2R-cre GFP tratados con vehículo (salino) (A), y con FGF21 ICV (B) o ratones D2R-cre shD2R + FGF21 ICV (C)

**B**

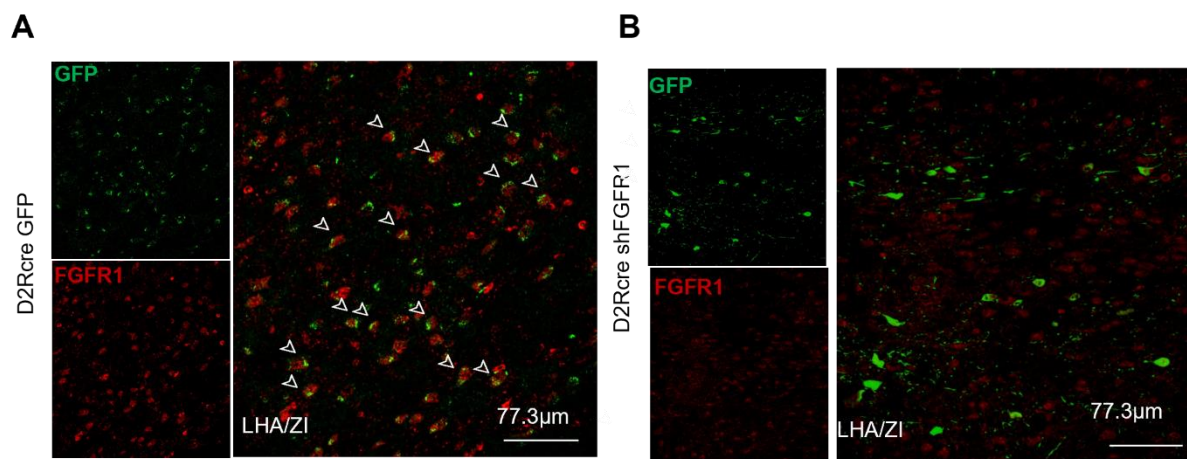


**C**



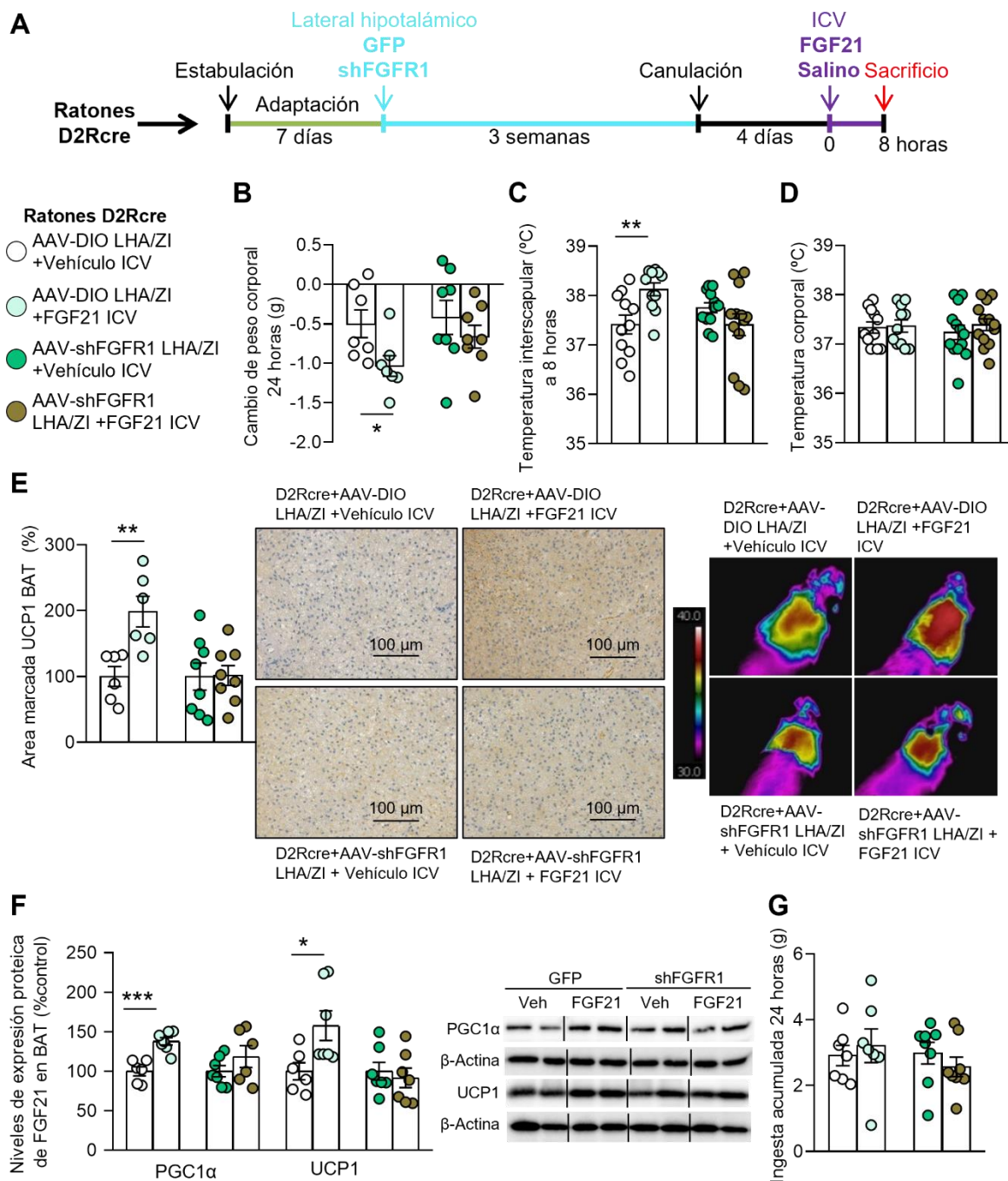
### 3.6. LOS EFECTOS DE FGF21 SOBRE LAS NEURONAS D2R EN LHA/ZI SE PRODUCEN A TRAVÉS DE FGFR1

Con el fin de comprobar que las neuronas D2R en LHA/ZI expresan FGFR1, a través del cual actúa directamente, realizamos una inmunofluorescencia que muestra la colocación de GFP y FGFR1 en el LHA/ZI de ratones D2R-Cre con GFP, mientras que en los ratones que silenciamos a FGFR1 no lo observamos (Figura 25).



**Figura 25.** Colocalización de GFP y FGFR1 en LHA/ZI en ratones D2R-cre. Microfotografía que muestra la colocación de GFP y FGFR1 en LHA/ZI de ratones D2Rcre GFP (Figura 21A) y ratones D2Rcre shFGFR1 (Figura 21B).

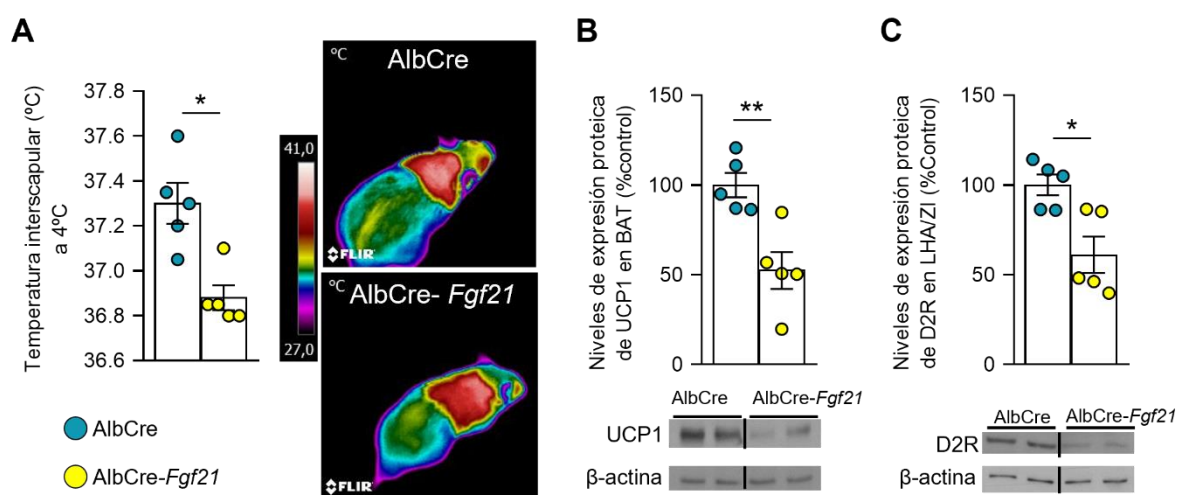
Teniendo en cuenta que las acciones del FGF21 sobre el peso corporal y la termogénesis en el BAT parecían ser dependientes de D2R, evaluamos si el FGF21 actúa directamente sobre las neuronas D2R del LHA/ZI. Para ello, se silenció selectivamente FGFR1 en las neuronas D2R de LHA/ZI mediante la administración estereotáxica de pAAV-SYN-DIO-EGFP en los controles o AAV8-SYN-shFGFR1 en el LHA/ZI de ratones D2R-Cre (Figura 26A). Al igual que en nuestras observaciones anteriores, se encontró una disminución del peso corporal inducida por el FGF21 (Figura 26B) y un aumento de la temperatura interescapular (Figura 26C), sin cambio en temperatura corporal (Figura 26D), incremento del marcaje de UCP1 (Figura 26E) y de los niveles de proteína PGC1 $\alpha$  y UCP1 (Figura 26F) en el BAT en los ratones GFP con FGF21, sin cambios en ingesta (Figura 26G). Estos efectos sobre el peso corporal y la termogénesis fueron abolidos en los ratones en los cuales se silenció FGFR1 específicamente en las neuronas D2R del LHA/ZI, lo cual confirma que el FGF21 actúa directamente sobre estas neuronas hipotalámicas a través de su receptor, el FGFR1.



**Figura 26. Efecto del bloqueo de FGFR1 en LHA/ZI en ratones D2R-cre con administración de FGF21 ICV.** Esquema del modelo animal (A), cambio de peso corporal (n=7-8) (B), temperatura interescapular y fotos térmicas representativas (n=11-13) (C), temperatura corporal (n=6-8) (D), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=6-8) (E), niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1α en BAT (n=6-7) (F), ingesta acumulada (n=7-8) (G). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test T de student (B-E, G) y test de Mann-Whitney (F).

### 3.7. EL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE FGF21 EN HÍGADO REDUCE LA RESPUESTA TERMOGÉNICA INDUCIDA POR FRÍO Y REDUCE LA EXPRESIÓN DE D2R EN LHA/ZI

Con el fin de profundizar en el mecanismo que relaciona la producción de FGF21 hepático con la expresión de D2R en el hipotálamo se usó un modelo de ratones deficientes de FGF21 en el hígado (KO de FGF21), con sus respectivos controles, que fueron sometidos a una exposición a frío de 6 h. Este experimento fue realizado en colaboración con la Dra. Guadalupe Sabio (Grupo “Papel de las quinasas activadas por el estrés en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer” del Centro Nacional de investigaciones Cardiovasculares, CNIC). El incremento en la actividad termogénica que se produce en respuesta al frío es considerablemente inferior en animales KO para FGF21 como se observa en las medidas de la T interscapular (Figura 27A) y los niveles de expresión de UCP1 en BAT (Figura 27B). Además de esto, se observó como los KO para FGF21 presentan una expresión reducida de D2R en el LHA/ZI (Figura 27C), lo cual refuerza la estrecha relación descrita entre FGF21 y el sistema dopaminérgico hipotalámico.



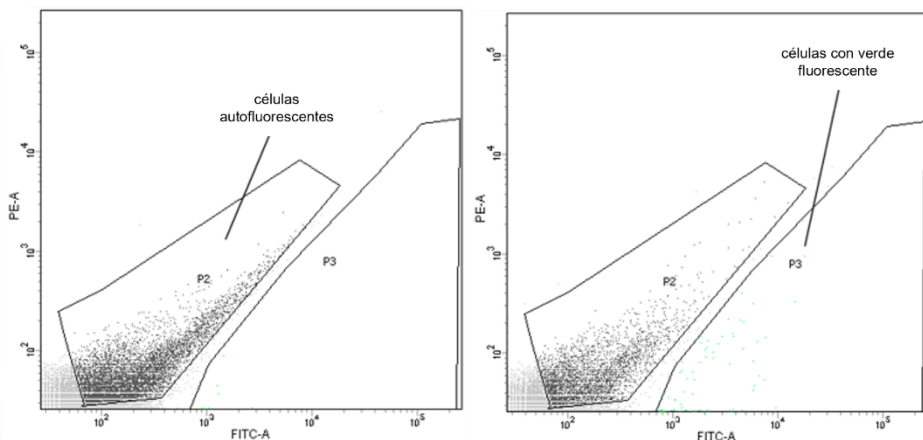
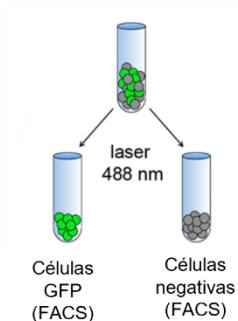
**Figura 27. Efecto de la exposición al frío en ratones KO para FGF21 en hígado.** Temperatura interscapular y fotos térmicas representativas (n=5) (A), niveles de expresión proteica de UCP1 en BAT (n=5) (B), y de D2R en LHA/ZI (n=5) (C). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Test T de *student* (A) y test de Mann-Whitney (B, C)

### 3.8. LOS EFECTOS METABÓLICOS DE FGF21 ESTÁN MEDIADOS POR LAS NEURONAS GABAÉRGICAS DEL LHA/ZI QUE EXPRESAN D2R

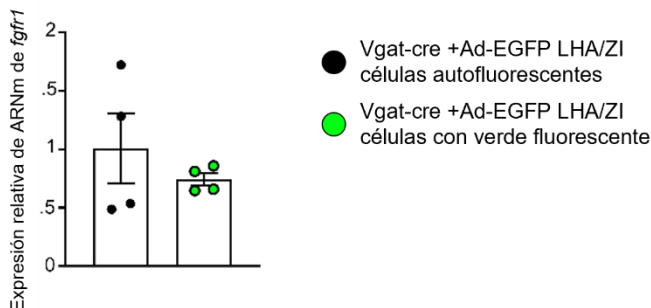
Resultados publicados recientemente por el grupo en el que desarrolló esta tesis doctoral revelaron que las neuronas de LHA/ZI necesarias para la acción termogénica del sistema dopaminérgico hipotalámico son neuronas GABAérgicas que expresan D2R [101]. Con el fin de determinar si la misma población neuronal está también involucrada en los efectos del FGF21 sobre la termogénesis, realizamos en colaboración con el Dr. Vicent Prevot (Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Inserm, University of Lille) un estudio de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para aislar las neuronas GABAérgicas que expresan D2R del LHA/ZI (Figura 28A). Se encontró que las neuronas GABAérgicas D2R aisladas de LHA/ZI expresaban ARNm de FGFR1, lo cual sugiere que podrían ser estas neuronas los efectores de las acciones metabólicas de FGF21 (Figura 28B).

**A**

Vgat-cre, Ad-EGFP LHA/ZI

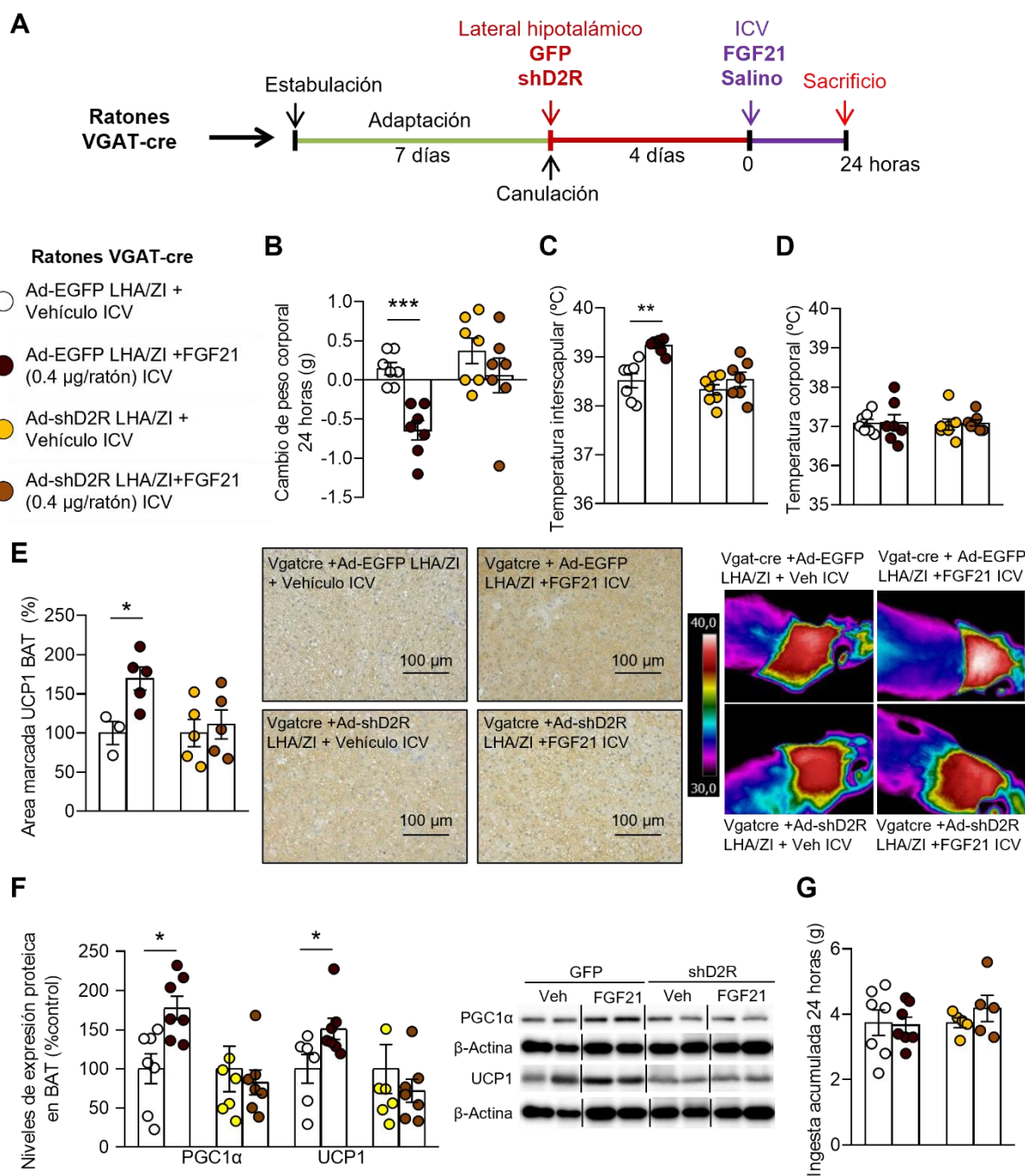


**B**



**Figura 28. Neuronas GABAérgicas D2R aisladas de LHA/ZI.** Clasificación de FACS para aislar neuronas que expresan D2R (GFP-positivo) en el LHA/ZI (A); El ARNm de *fgfr1* se expresa en células D2R aisladas de LHA/ZI (n = 4) (B) Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Test T de *student*.

Con el fin de comprobar si realmente son las neuronas GABAérgicas del LHA/ZI las responsables de la interacción de FGF21 sobre el sistema dopaminérgico se silenció D2R específicamente en las neuronas GABAérgicas del LHA/ZI mediante la administración de un vector viral Ad-hSyn-DIO-EGFP (controles) o Ad-hSyn-DIO-shD2R-EGFP en el LHA/ZI de los ratones Vgat-Cre (Figura 29A). Tal como ocurrió en los experimentos anteriores, la administración ICV de FGF21 en los ratones control indujo la esperada disminución del peso corporal (Figura 29B), y el incremento del programa termogénico (Figura 29C-29F). Sin embargo, estos efectos desaparecieron en los ratones en los cuales se silenció selectivamente el D2R en las neuronas GABA del LHA/ZI (Figuras 29B-29F), sin variaciones en la ingesta de alimentos (Figura 29G). Estos resultados demuestran que los efectos metabólicos del FGF21 están mediados por las neuronas GABAérgicas del LHA/ZI que expresan D2R.



**Figura 29.** Efecto del bloqueo de D2R en neuronas GABAérgicas de LHA/ZI en ratones *Vgat-cre* con administración de FGF21 ICV. Esquema del modelo animal (A), cambio de peso corporal (n=7) (B) Temperatura interscapular y fotos térmicas representativas (n=7) (C), temperatura corporal (n=7) (D), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=3-5) (E), niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1α en BAT (n=6-7) (F), ingesta acumulada (n=5-7) (G). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó β-actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Test T de *student* (B-E, G) y test Mann-Whitney (F).

Como control de que la administración del virus se realizó en la zona correcta se realizó un estudio de colocalización de GFP y Vgat mediante inmunofluorescencia, que demostró que la infección del vector viral se realizó específicamente en las neuronas GABAérgicas de LHA/ZI (Figura 30).

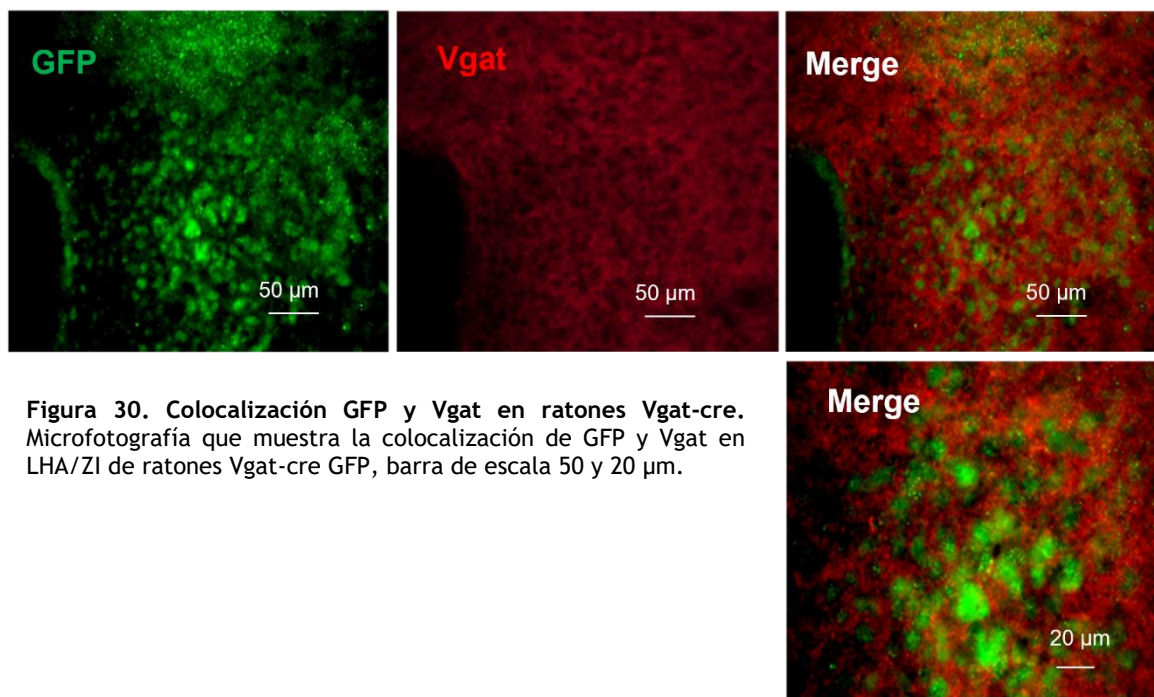


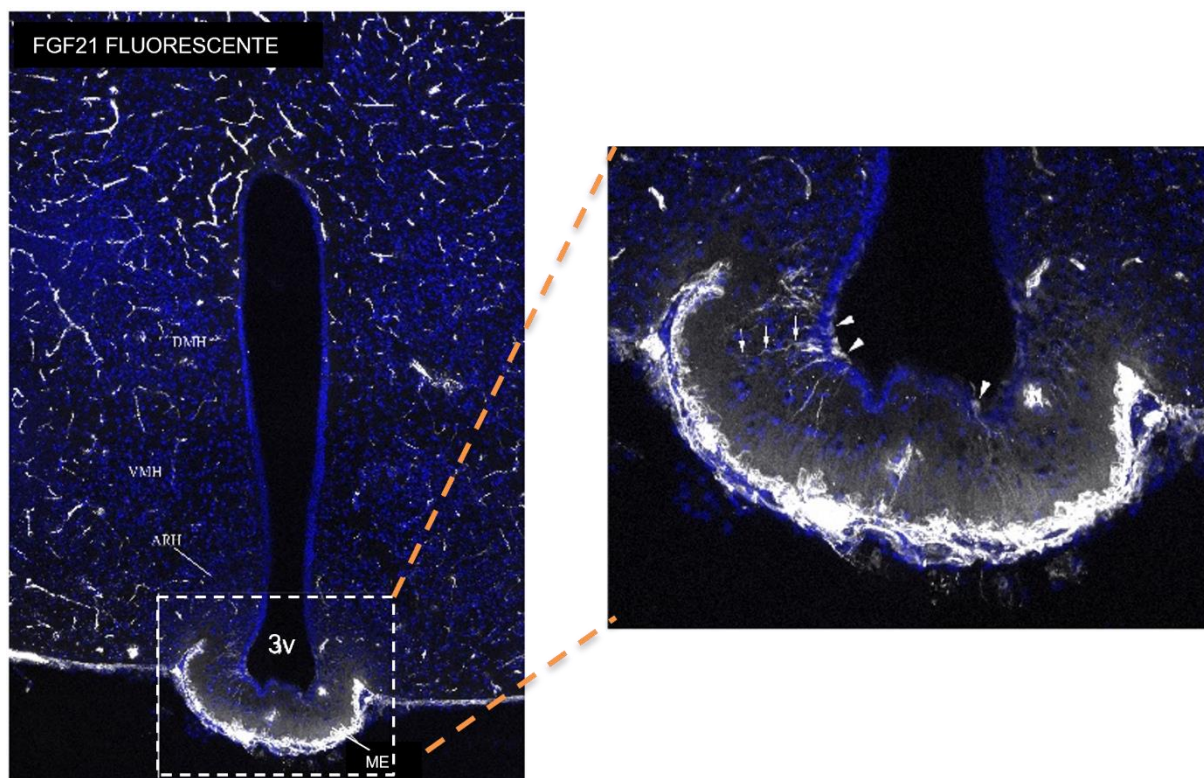
Figura 30. Colocalización GFP y Vgat en ratones Vgat-cre. Microfotografía que muestra la colocalización de GFP y Vgat en LHA/ZI de ratones Vgat-cre GFP, barra de escala 50 y 20 µm.

## 4. LOS TANICITOS DE LA EMINENCIA MEDIA TRASPORTAN EL FGF21 PRODUCIDO A NIVEL HEPÁTICO AL HIPOTÁLAMO

Una vez determinada la acción directa del FGF21 producido a nivel hepático sobre el sistema dopaminérgico hipotalámico se planteó cual podría ser la vía de entrada de este FGF21 periférico al hipotálamo. Puesto que la principal puerta de entrada de señales metabólicas al hipotálamo es la ME, y teniendo en cuenta que otras señales (leptina y ghrelina) requieren transporte activo por medio de los tanicitos, quisimos determinar por medio de que vía llega FGF21 al LHA/ZI.

### 4.1. EL FGF21 PERIFÉRICO ACCEDA A LOS TANICITOS DE LA ME

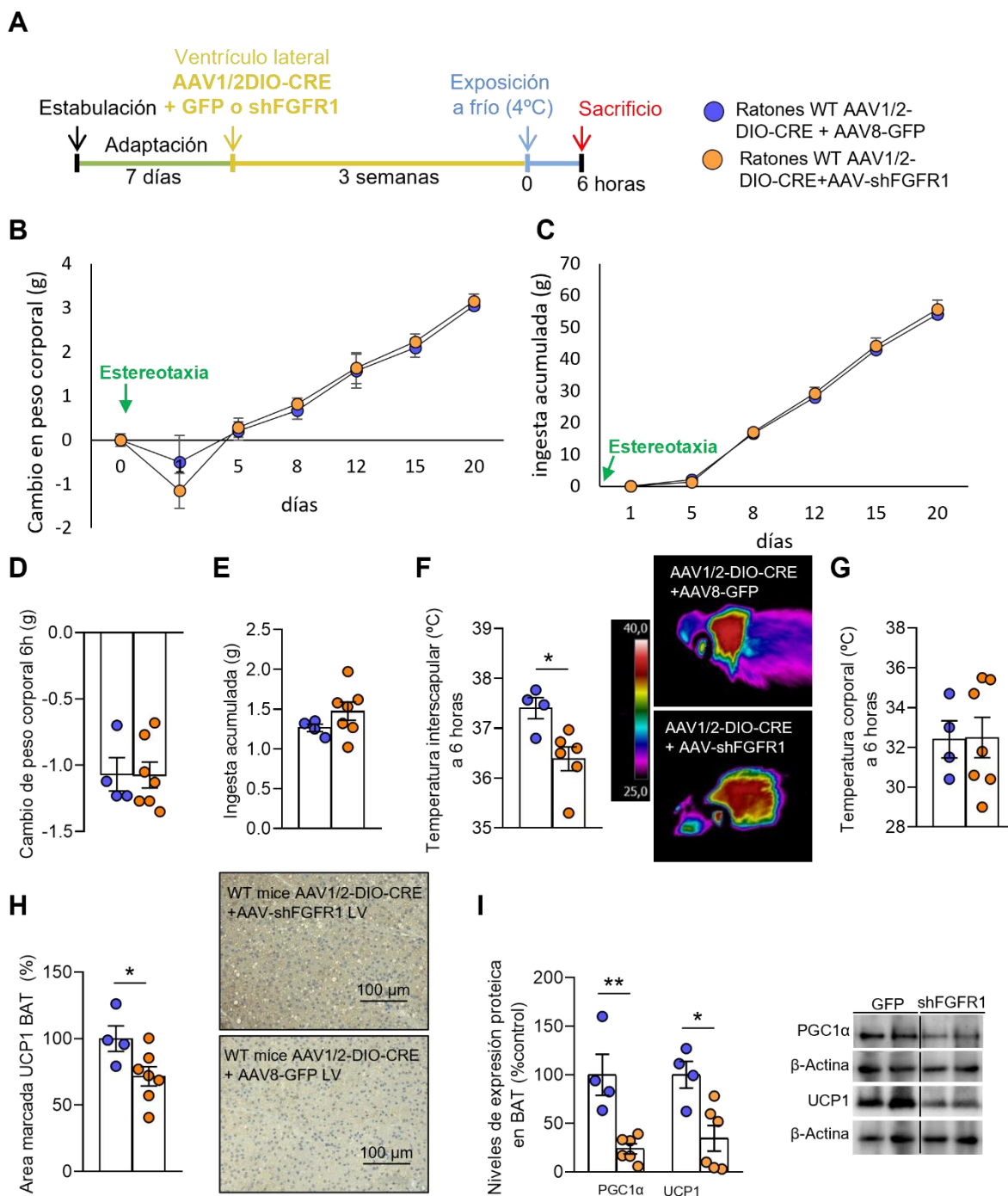
Tras la inyección de FGF21 marcado con fluorescencia a través de la vena yugular de ratones se detectaron niveles de este FGF21 fluorescente en los tanicitos de la ME (Figura 31), lo que sugiere que se emplea la misma lanzadera tanicítica para transportar el FGF21 hepático al hipotálamo que utilizan otras señales metabólicas.



**Figura 31.** FGF21 fluorescente en la ME. Microfotografía representativa de la región tuberal del hipotálamo de un ratón WT que muestra procesos tanicíticos (flechas) y cuerpos celulares (puntas de flecha) marcados con FGF21 fluorescente en la ME (recuadro), 1 min después de la inyección en la vena yugular.

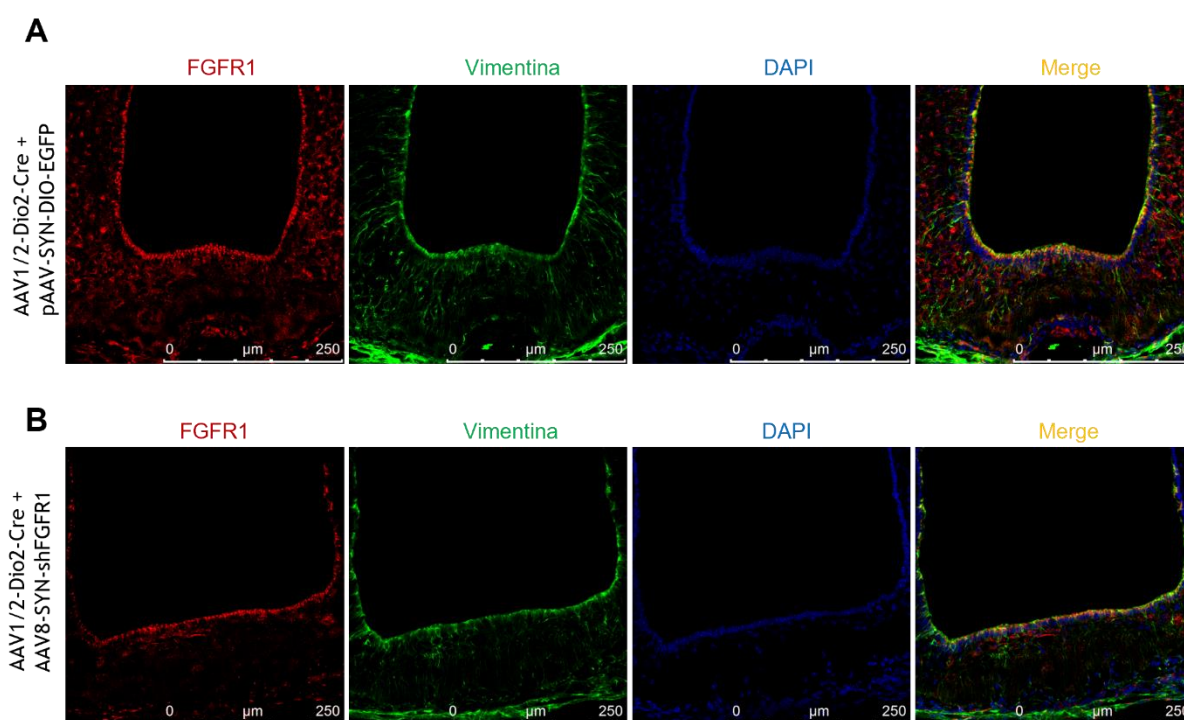
#### 4.2. EL TRASPORTE DE FGF21 PERIFÉRICO SE EFECTÚA POR MEDIO DE LOS TANICITOS DE LA ME

Para comprobar si tal como parece el transporte de FGF21 producido en el hígado al hipotálamo se efectúa por medio de los tanicitos, decidimos inhibir la expresión de FGFR1 específicamente en los tanicitos de ratones. Para ello, se realizó una estereotaxia en ventrículo lateral mediante la coadministración de dos vectores virales: el AAV1/2-DIO-CRE que nos ayuda a vehicular el virus a la zona de los tanicitos, junto con el pAAV-SYN-DIO-EGFP (control) o AAV8-SYN-shFGFR1 que silencia selectivamente FGFR1 en los tanicitos (Figura 32A). Se realizó un seguimiento de peso corporal (Figura 32B) e ingesta (Figura 32C) durante 3 semanas, tiempo que tarda el virus en hacer efecto, sin observar ningún cambio. A continuación, se realizó una prueba de exposición al frío, introduciendo a los ratones en una cámara fría a 4 °C, durante 6 h. Observamos que durante esas 6 h tanto en peso corporal (Figura 32D) como en ingesta (Figura 32E) no se ven diferencias entre ambos grupos, pero los ratones que presentaban la inhibición de FGFR1 en los tanicitos perdían más temperatura en la zona interescapular (Figura 32F), sin modificar la temperatura corporal (Figura 32G), a comparación de los controles GFP. Además, analizamos los niveles de inmunomarcaje de UCP1 y observamos que los ratones con la inhibición de FGFR1 tienen menor marcaje (Figura 32H), así como menores niveles proteicos de PGC1 $\alpha$  y UCP1 (Figura 32I) en BAT que sus controles.



**Figura 32. Efecto de la inhibición de FGFR1 en tanicitos sobre la termogénesis.** Esquema del modelo animal (A), cambio de peso corporal (n=7) (B) e ingesta acumulada (n=5-7) (C) durante las 3 semanas de infección. Análisis de los efectos de la prueba de exposición al frío durante 6 h en cambio de peso corporal (D), ingesta acumulada de CD (E), temperatura interscapular y fotos térmicas representativas (n=7) (F), temperatura corporal (n=7) (G), cuantificación del área marcada de UCP1 en BAT e imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 (n=4-7) (H), niveles de expresión proteica de UCP1 y PGC1 $\alpha$  en BAT (n=4-6) (I). Los datos de proteínas se expresaron en relación con los animales de control (%). Se utilizó  $\beta$ -actina para normalizar los niveles de proteínas. Las líneas divisorias indican empalmes dentro del mismo gel. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas están indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Test T de *student* (B-H) y test de Mann-Whitney (I).

Para corroborar que la infección fue efectiva en la zona de interés, se realizó la inmunofluorescencia de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que marca los núcleos celulares, junto con vimentina (marcador específico de tanicitos) y el receptor FGFR1, observando que efectivamente hay colocalización de los marcadores (Figura 33A), por lo que la infección fue efectiva en tanicitos, y además observamos que los ratones con la inhibición de FGFR1 tienen menor marcaje de FGFR1 (Figura 33B), en comparación con los controles (Figura 33A).



**Figura 33. Colocalización de FGFR1 y Vimentina en la ME de ratones WT con inhibición de FGFR1 en tanicitos.** Microfotografía que muestra la colocalización de FGFR1 y vimentina en la ME de ratones WT control GFP (AAV1/2-Dio2-Cre + pAAV-SYN-DIO-EGFP) (Figura 31 A) y ratones con inhibición de FGFR1 (AAV1/2-Dio2-Cre + AAV8-SYN-shFGFR1) (Figura 31 B) en tanicitos.



# DISCUSIÓN



Los datos presentados en esta tesis describen un novedoso mecanismo fisiológico mediante el cual la lactancia materna contrarresta los efectos de la DIO al actuar como un estimulador de la termogénesis del BAT a largo plazo. Se muestra en este trabajo como ratas adultas alimentadas con HFD, que fueron expuestas a períodos de DW en la etapa neonatal, presentan una activación del programa termogénico del BAT que estimula el EE, impidiendo en última instancia el incremento en la adiposidad, la dislipidemia y el aumento de peso asociado a la ingesta de una dieta hipercalórica. El mecanismo subyacente a esta acción protectora implica unos niveles elevados de expresión y secreción de FGF21 hepático, que a nivel del SNC activa las neuronas GABAérgicas localizadas en el LHA/ZI sobreexpresando D2R a este nivel. En conjunto, estos datos implican que, modificando la interacción madre-lactante durante una ventana temporal postnatal específica, es posible reprogramar determinados circuitos hipotalámicos dando lugar a efectos metabólicos beneficiosos permanentes a lo largo de la vida.

Diferentes estudios han demostrado que la etapa neonatal es un período clave en el desarrollo del individuo a lo largo de su vida hasta la edad adulta. Así, existen evidencias de que la exposición temprana a una nutrición excesiva puede resultar en una programación metabólica alterada que conduce a una mayor susceptibilidad a la obesidad, la inflamación y las complicaciones metabólicas. Especialmente, la ventana de lactancia es un período crítico durante el cual las exposiciones nutricionales y ambientales afectan al riesgo de enfermedad metabólica de por vida. Debido a que los órganos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa continúan la diferenciación y el crecimiento durante el período de lactancia, son vulnerables a las influencias de programación durante este período [332]. Sin embargo, los mecanismos responsables de los efectos beneficiosos de la lactancia materna sobre la salud en la infancia y la edad adulta siguen siendo en gran medida desconocidos.

El efecto de las alteraciones nutricionales de la madre durante el período de lactancia sobre la programación de la obesidad en la descendencia ha sido ampliamente estudiado en modelos animales [325-328]. Así, un estudio reciente demostró que la exposición materna a la HFD durante la ventana de la lactancia programa la adiposidad de la descendencia, la inflamación y alteraciones en la homeostasis de la glucosa [333]. Sin embargo, aunque los estudios en animales han sugerido que la sobrealimentación neonatal es un parámetro crítico que influye en los resultados metabólicos a largo plazo [329-331], apenas existen estudios relativos a la influencia de la alimentación o la lactancia de las propias crías en la reprogramación a largo plazo del balance energético. Además, los datos publicados hasta el momento en humanos son controvertidos. Por una parte, existen trabajos que no han encontrado ninguna relación entre la lactancia materna y el menor riesgo de sobrepeso y obesidad. Hay que tener en cuenta que la ausencia de asociación puede ser debida a efectos de una amplia variedad de factores de confusión que afectan tanto a la madre como al niño (por ejemplo, las condiciones socioeconómicas, la dieta materna, la composición de la leche de fórmula, etc.) y se acumulan a lo largo de la vida, que podrían actuar *per se* como factores de riesgo de la obesidad [244, 295, 311-316, 334, 335].

Por esta razón, el modelo DW desarrollado en el presente trabajo constituye un modelo animal novedoso, caracterizado por condiciones experimentales controladas que minimizan los factores de confusión y permiten identificar e investigar estos efectos duraderos y sus mecanismos subyacentes, ya que partimos de camadas homogéneas, y madres con pesos y edades similares, alimentadas con dieta estándar. Así evidenciamos que los efectos protectores encontrados en nuestro modelo son producidos por mecanismos directamente derivados de la DW y no asociados a otros factores.

Nuestro modelo animal revela que las ratas amamantadas durante períodos prolongados están protegidas contra el aumento de peso inducido por la ingesta de una HFD. Los efectos

descritos, son independientes de la ingesta de alimentos y se encuentran en gran parte mediados por una activación de la termogénesis en el BAT que lleva asociado un aumento del EE lo cual indica que la DW es un estímulo fisiológico que modula la función de BAT.

En particular, cuando las ratas sometidas a DW y alimentadas con HFD son expuestas al frío, el principal activador fisiológico de la termogénesis, observamos que también eran más eficientes en el mantenimiento de su temperatura corporal. Cabe destacar que el incremento de EE y termogénesis fueron observados en condiciones de termoneutralidad, con lo que conseguimos eliminar el metabolismo adicional necesario para defender la temperatura corporal a temperaturas más bajas. Además, observamos mayor captación de glucosa en el BAT mediante la técnica PET-CT en las ratas con DW. Esto va en línea con lo encontrado en estudios previos del grupo, ya que observaron también un aumento del *browning* del WAT en el modelo DW. La idea de que ésta mejora de la acción termogénica del tejido adiposo podría tener relevancia clínica está respaldada por las pruebas que demuestran que la activación del BAT está inversamente correlacionada con el IMC en humanos [336-339] y que los adipocitos beige humanos parecen tener capacidad termogénica [176, 340]. Dada la relevancia de estos descubrimientos, se han realizado grandes esfuerzos para identificar los mecanismos subyacentes a la activación e inactivación de estos tejidos, con la esperanza de diseñar estrategias potenciales para luchar contra la obesidad y los trastornos metabólicos asociados, como la DMT2. La mayor actividad en BAT y adipocitos beige activa aumenta el EE y se asocia con una reducción de la hiperglucemia y la hiperlipidemia, mientras que su atrofia e inactivación se han asociado con obesidad [182]. Estos resultados están en consonancia con datos anteriores que indican que PPAR $\alpha$ , una molécula que induce la vía termogénica [341], se encuentra elevado en las células mononucleares de la sangre periférica de los bebés amamantados con leche materna con respecto a los alimentados con fórmula [342]. Además, de esto se ha publicado recientemente que el destete precoz en ratas disminuye la capacidad termogénica del BAT, sugiriendo que períodos cortos de lactancia podrían constituir un factor de riesgo para el desarrollo de obesidad en la edad adulta [343].

En la búsqueda de posibles mecanismos subyacentes a los efectos de DW, especialmente su capacidad para estimular la termogénesis y el EE, decidimos centrarnos en el FGF21, una hormona metabólica que está fuertemente regulada en los ratones recién nacidos. FGF21 se ha propuesto como un factor derivado del hígado y que está directamente implicado en la activación de la termogénesis en el BAT [178, 229]. Además, se ha descrito que, aunque sus niveles son muy bajos en los fetos, los niveles circulantes de FGF21 aumentan drásticamente tras el nacimiento y el inicio de la lactancia [241, 344]. En concordancia con estos datos, en el modelo animal desarrollado en este trabajo, las crías DW presentan una producción elevada de FGF21 en el hígado ya en el momento del destete que además se mantiene elevada a lo largo de la vida, tanto en hígado como en BAT, y que se ve reflejada de un incremento en los niveles circulantes de FGF21 en la edad adulta.

Con el fin de determinar si esta elevación en los niveles de FGF21 en los animales DW podría ser consecuencia de una transmisión de FGF21 desde la madre a las crías a través de la leche materna, se determinaron los niveles de FGF21 en leche materna y plasma de madres a día 21 de lactancia (SW) y a día 28 (DW). No se encontraron diferencias en los niveles de FGF21 circulantes ni en leche de madres con DW en referencia a las de SW. Por tanto, nuestros datos estarían indicando que algún mecanismo intrínseco a las crías activado por la DW podría ser el causante de este incremento en la producción de FGF21. Se ha descrito en un trabajo previo que la elevación en los niveles de FGF21 que tiene lugar en las crías inmediatamente después del nacimiento y durante el período de lactancia está asociada con una inducción de la expresión génica del FGF21 hepático en respuesta al aporte de los ácidos grasos contenidos en

la leche materna, lo que provoca un incremento de los niveles de ácidos grasos libres en las crías amamantadas [241, 344]. Acorde con esto, en nuestro modelo observamos que las crías con DW sacrificadas tras el destete muestran incrementada la producción de FGF21 en hígado, lo que ocurre en paralelo a unos mayores niveles circulantes de ácidos grasos libres en los animales con DW respecto a los que han sido sometidos a períodos de SW.

En la bibliografía se ha descrito que el incremento masivo de la concentración plasmática de FGF21 durante el período de lactancia en neonatos, es el resultado de un incremento en la producción hepática de dicho factor, el cual actúa sobre el BAT produciendo la activación de la termogénesis [178, 229]. En este sentido, en nuestro estudio observamos incrementada la termogénesis ya en edades tempranas, en las ratas tras el destete con DW, respecto de ratas con dieta estándar. Apoyando el papel del aumento del FGF21 hepático y circulante en respuesta a la DW en la resistencia a la DIO, la inhibición de la sobreproducción de FGF21 en el hígado del modelo animal DW revirtió los efectos beneficiosos de la DW sobre el peso corporal, la masa grasa y la termogénesis a los niveles observados en animales con SW. Corroborando el papel de FGF21 mediando la acción de la DW sobre la termogénesis, se observó que ratones KO para FGF21 a nivel hepático presentaban disminuida su capacidad termogénica con respecto a ratones WT.

A la vista de los datos que demuestran un efecto protector de la lactancia materna frente al incremento del peso corporal en respuesta a una HFD, se planteó la cuestión de si este efecto se produciría directamente sobre el BAT o si por el contrario podría estar mediado a nivel central. A nivel del SNC, el hipotálamo es el principal centro regulador de la homeostasis energética. Se ha demostrado que la nutrición perinatal regula el desarrollo del hipotálamo y puede provocar alteraciones metabólicas que se mantienen a largo plazo [36, 345, 346]. Así mismo se ha observado que diferentes modificaciones del estado fisiológico de la madre durante el periodo de lactancia alteran los circuitos hipotalámicos de la descendencia adulta [347-349]. En este contexto, recientemente nuestro grupo ha descrito un nuevo mecanismo hasta el momento desconocido mediado por el sistema dopaminérgico hipotalámico que regula el metabolismo activando la termogénesis [101]. Clásicamente, los mecanismos por los que la dopamina central afecta al peso corporal se relacionan con el patrón de ingesta y los mecanismos cerebrales de recompensa [345, 350], pero no habían sido asociados con la modulación de la termogénesis. Los datos previos del grupo de investigación han descrito el mecanismo que involucra al sistema dopaminérgico del LHA activando la termogénesis, produciendo marcados efectos sobre el peso corporal y EE [101]. Teniendo en cuenta el papel de este mecanismo sobre la termogénesis, se planteó si los efectos sobre el metabolismo ejercidos por la DW podrían estar mediados de alguna manera por el sistema dopaminérgico hipotalámico. Los datos presentados en esta tesis doctoral demuestran que los animales sometidos a períodos de DW presentan mayor actividad dopaminérgica en LHA/ZI, como se muestra con la mayor expresión del D2R en esta zona hipotalámica. Además, como confirmación de esto, el bloqueo de esta expresión del D2R en el LHA/ZI de ratas DW, revierte los efectos beneficiosos tanto sobre termogénesis, como en EE. Por tanto, el sistema dopaminérgico hipotalámico está implicado en el efecto protector de la lactancia materna.

Existen datos en la bibliografía referentes al efecto que el FGF21 producido en el hígado ejerce a nivel hipotalámico sobre distintos núcleos y mecanismos asociados al control de la homeostasis energética [351, 352]. Un estudio reciente observó que FGF21 previene la pérdida de neuronas dopaminérgicas y muestra efectos beneficiosos contra el síndrome de enfermedad de Parkinson, aunque esta relación la observan en sustancia negra par compacta y núcleo estriado [353]. Teniendo en cuenta la sobreexpresión de FGF21 hepático implicada en el efecto protector de nuestro modelo, nos planteamos determinar si estos niveles elevados de FGF21

podrían ser los responsables de la activación central del sistema dopaminérgico. Los presentes datos describen por primera vez la existencia de una interacción entre FGF21 y el sistema dopaminérgico en el LHA dado que el bloqueo de la sobreexpresión de FGF21 hepático en animales con DW revierte la sobreexpresión de D2R en el LHA y los efectos metabólicos beneficiosos de la DW. Es importante destacar que el FGF21 parece actuar directamente sobre un subconjunto de neuronas LHA/ZI que expresan D2R a través de su receptor, el FGFR1, que forma un complejo con  $\beta$ -Klotho para mediar en las acciones del FGF21 sobre la homeostasis energética [354, 355]. Incluso en un estudio con humanos observaron que una mutación en FGFR1 disminuye la señalización del regulador metabólico FGF21 al afectar la asociación de FGFR1 con el co-receptor  $\beta$ -Klotho [356].

El LHA y la ZI son áreas cerebrales heterogéneas que contienen numerosas poblaciones celulares genéticamente distintas. Se ha descrito previamente por el grupo que el receptor dopaminérgico D2R se expresa en estas zonas hipotalámicas, tanto en las células glutamatérgicas como en las GABAérgicas, pero que sólo la expresión del D2R en las neuronas GABAérgicas es responsable de los marcados efectos sobre el peso corporal [101]. En el presente trabajo, demostramos que las acciones termogénicas del FGF21 están mediadas específicamente por la expresión de D2R en las neuronas GABAérgicas LHA/ZI, ya que al bloquear la expresión del D2R específicamente en estas neuronas se consiguió revertir el fenotipo, eliminando el efecto termogénico de FGF21.

Además, la esteatosis hepática que se observa comúnmente en animales DIO, también se mejoró en ratas con DW y se revirtió cuando se silenció FGF21 en hígado y D2R en el LHA/ZI. Aunque hasta el momento no se había descrito la interacción entre FGF21 y sistema dopaminérgico en LHA para modular el metabolismo, si se habían descrito previamente efectos centrales de FGF21 sobre otras áreas hipotalámicas o subconjuntos neuronales para ejercer diferentes efectos de forma específica. Así, tal como lo publicaron recientemente Jensen-Cody y colaboradores, FGF21 ejerce un efecto sobre la regulación de la preferencia por la comida a través de su acción sobre las neuronas glutamatérgicas del VMH [351]. Posteriormente el mismo grupo también publicó que la señalización de FGF21 en neuronas glutamatérgicas del VMH es necesaria para la protección contra el aumento de peso corporal y la inducción de UCP1 en los tejidos adiposos asociados con la restricción de proteínas en la dieta [352]. Estos datos describen un efecto en neuronas glutaminérgicas de VMH de FGF21 similar a lo que observamos en nuestro trabajo mediado por neuronas GABAérgicas en LHA. Cabe destacar que tanto el LHA como el VMH son dos de las áreas hipotalámicas donde se encuentra la expresión del D2R, y ambos son centros importantes en el control de la actividad del BAT [357].

Tras determinar que FGF21 periférico presenta una acción central en el hipotálamo, en el presente trabajo se planteó determinar cual podría ser la ruta a través de la que FGF21 periférico accede a las neuronas diana en el hipotálamo. Hasta el momento en la bibliografía se ha descrito que FGF21 atraviesa la BHE, ya que varios estudios han reportado que FGF21 muestra una afluencia significativa, no saturable y unidireccional a través de la BHE [237]. La principal puerta de entrada al hipotálamo de las señales metabólicas circulantes es la ME, un órgano circunventricular que recubre la base del tercer ventrículo y se caracteriza por capilares con un endotelio fenestrado. Distintas señales metabólicas circulantes como la leptina y la ghrelina entran en el parénquima de la ME por difusión pasiva a través de los capilares fenestrados [124, 125] con el fin de alcanzar estructuras hipotalámicas más profundas, estas señales requieren un transporte activo por una glía hipotalámica especializada llamada tancítica [125, 126, 358].

La forma y la ubicación de los tancitos los colocan en una posición ideal para conectar la periferia con los compartimentos nerviosos centrales. En línea con esto, los tancitos controlan

el transporte de hormonas y metabolitos clave dentro y fuera del hipotálamo. Funcionan además como sensores de homeostasis periférica para redes reguladoras centrales [127, 128].

En el presente trabajo se comprobó que FGF21 circulante accede al hipotálamo a través de los tanicitos, ya que tras la inyección de FGF21 fluorescente a través de la vena yugular, se detectó positividad en tanicitos de la ME. Además, el bloqueo de FGFR1 específicamente en tanicitos de ratón impide la activación termogénica tras la exposición al frío, que se observó en ratones control. Todo esto sugiere que el FGF21 periférico emplea el mismo transbordador tancítico para acceder al hipotálamo que es utilizado por otras señales metabólicas como la leptina o la ghrelina [124, 125].

Además, estudios previos del grupo han demostrado que la resistencia a leptina, característica de la DIO, se vio reducida de manera importante en el modelo animal de DW. Curiosamente, esto también abre la posibilidad de que el aumento de la producción hepática de FGF21 después de una succión prolongada, que alivia la resistencia a la leptina inducida por HFD, también podría modular su propio acceso, así como el acceso de otras moléculas para dirigirse a las neuronas hipotalámicas al aumentar la maquinaria de transporte tancítico, sin embargo, estos aspectos aún quedan por profundizar en investigaciones futuras.

En resumen, este estudio revela, en primer lugar, que el DW en ratas, protege contra la DIO en la edad adulta mediante la activación de la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT, la reducción del peso corporal y la masa grasa, y la mejora de la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la leptina, todo ello sin alterar la ingesta de alimentos. En segundo lugar, estas consecuencias del DW son el resultado de una regulación al alza de la producción de FGF21 hepático, que se traduce en un aumento de los niveles circulantes de FGF21, que a su vez acceden al cerebro a través de los tanicitos. En tercer lugar, una vez en el hipotálamo, el FGF21 actúa sobre las neuronas GABAérgicas D2R del LHA/ZI, que también expresan FGFR1, para ejercer sus efectos sobre el peso corporal y la termogénesis (Figura 33).

Además de crear nuevas vías de intervención para mejorar el resultado metabólico de los neonatos que van a estar expuestos a dietas hipercalóricas a lo largo de su vida, estos hallazgos sientan las bases de una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen a la remodelación fisiológica a largo plazo inducida por los eventos de la vida temprana, con múltiples beneficios potenciales para la salud.

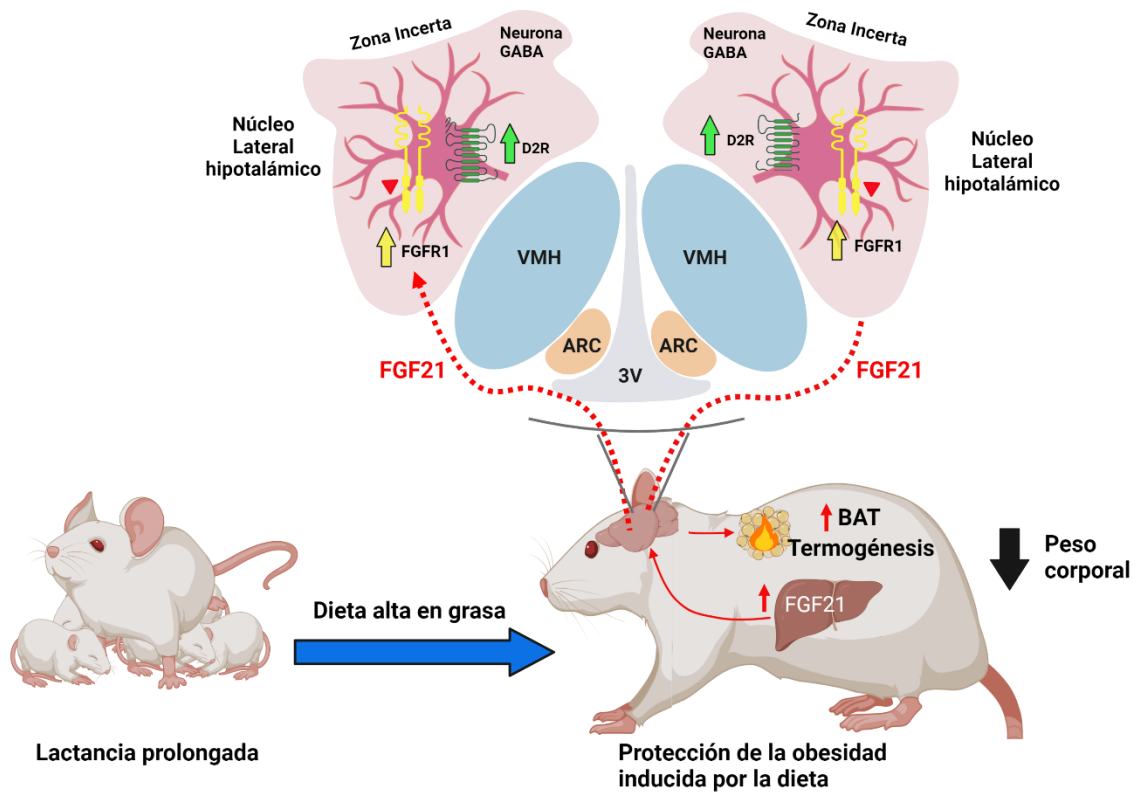


Figura 33. Esquema resumen de los principales hallazgos de este estudio.

# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La lactancia materna prolongada en rata protege frente el desarrollo de obesidad inducida por dieta en la edad adulta disminuyendo el peso corporal. Este efecto está mediado por un incremento en la producción de FGF21 hepático responsable de la activación de la termogénesis en la BAT y el incremento del EE.
2. El FGF21 modula el sistema dopaminérgico en el hipotálamo, ya que activa las neuronas GABAérgicas D2R del LHA/ZI, que expresan FGFR1 para ejercer sus efectos sobre el peso corporal y la termogénesis
3. El FGF21 circulante, que se encuentra incrementado en el modelo de lactancia materna prolongada accede al hipotálamo a través de los tanicitos y este transporte es necesario para la modulación del sistema dopaminérgico hipotalámico en el modelo de lactancia prolongada.



# BIBLIOGRAFÍA



## REFERENCES

1. Nittari, G., et al., *Fighting obesity in children from European World Health Organization member states. Epidemiological data, medical-social aspects, and prevention programs*. Clin Ter, 2019. **170**(3): p. e223-e230.
2. Cecchini, M. and S. Vuik, *The heavy burden of obesity*. 2019.
3. Fruhbeck, G., et al., *The ABCD of Obesity: An EASO Position Statement on a Diagnostic Term with Clinical and Scientific Implications*. Obes Facts, 2019. **12**(2): p. 131-136.
4. Organization, W.H. *Obesity and overweight*. 2019; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
5. Williams, J., et al., *A Snapshot of European Children's Eating Habits: Results from the Fourth Round of the WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI)*. Nutrients, 2020. **12**(8).
6. Garcia-Solano, M., et al., *[Weight status in the 6- to 9-year-old school population in Spain: results of the ALADINO 2019 Study]*. Nutr Hosp, 2021. **38**(5): p. 943-953.
7. Friedman, J.M., *Modern science versus the stigma of obesity*. Nat Med, 2004. **10**(6): p. 563-9.
8. Greenway, F.L., *Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(8): p. 1188-96.
9. Myers, M.G., Jr. and D.P. Olson, *Central nervous system control of metabolism*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 357-63.
10. Williams, E.P., et al., *Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem*. Curr Obes Rep, 2015. **4**(3): p. 363-70.
11. LeBlanc, E.L., et al., in *Behavioral and Pharmacotherapy Weight Loss Interventions to Prevent Obesity-Related Morbidity and Mortality in Adults: An Updated Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force*. 2018: Rockville (MD).
12. Jehan, S., et al., *Energy imbalance: obesity, associated comorbidities, prevention, management and public health implications*. Adv Obes Weight Manag Control, 2020. **10**(5): p. 146-161.
13. Patalano, R., et al., *An Innovative Approach to Designing Digital Health Solutions Addressing the Unmet Needs of Obese Patients in Europe*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(2).
14. O'Connor, E.A., et al., *Screening for Obesity and Intervention for Weight Management in Children and Adolescents: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force*. JAMA, 2017. **317**(23): p. 2427-2444.
15. Bondyra-Wisniewska, B., J. Myszkowska-Rygiak, and A. Harton, *Impact of Lifestyle Intervention Programs for Children and Adolescents with Overweight or Obesity on Body Weight and Selected Cardiometabolic Factors-A Systematic Review*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(4).
16. MacLean, P.S., et al., *Peripheral metabolic responses to prolonged weight reduction that promote rapid, efficient regain in obesity-prone rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(6): p. R1577-88.
17. Pena-Leon, V., R. Perez-Lois, and L.M. Seoane, *mTOR Pathway is Involved in Energy Homeostasis Regulation as a Part of the Gut-Brain Axis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
18. Ruban, A., et al., *Current treatments for obesity*. Clin Med (Lond), 2019. **19**(3): p. 205-212.
19. Camilleri, M. and A. Acosta, *Combination Therapies for Obesity*. Metab Syndr Relat Disord, 2018. **16**(8): p. 390-394.
20. Tak, Y.J. and S.Y. Lee, *Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand?* Curr Obes Rep, 2021. **10**(1): p. 14-30.
21. Folgueira, C., L.M. Seoane, and F.F. Casanueva, *The brain-stomach connection*. Front Horm Res, 2014. **42**: p. 83-92.

22. Barja-Fernandez, S., et al., *Peripheral signals mediate the beneficial effects of gastric surgery in obesity*. *Gastroenterol Res Pract*, 2015. **2015**: p. 560938.
23. Evers, S.S., D.A. Sandoval, and R.J. Seeley, *The Physiology and Molecular Underpinnings of the Effects of Bariatric Surgery on Obesity and Diabetes*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 313-334.
24. Kelly, A.S., et al., *Pediatric obesity pharmacotherapy: current state of the field, review of the literature and clinical trial considerations*. *Int J Obes (Lond)*, 2016. **40**(7): p. 1043-50.
25. Kelly, A.S., et al., *Severe obesity in children and adolescents: identification, associated health risks, and treatment approaches: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2013. **128**(15): p. 1689-712.
26. Lukaszewski, M.A., et al., *Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. **305**(10): p. E1195-207.
27. Bernard, C. and L. Langley, *Homeostasis: Origins of the concept*. 1878.
28. Cannon, W.B.J.P.r., *Organization for physiological homeostasis*. 1929. **9**(3): p. 399-431.
29. Ramsay, D.S. and S.C. Woods, *Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation*. *Psychol Rev*, 2014. **121**(2): p. 225-47.
30. Ramsay, D.S. and S.C. Woods, *Physiological Regulation: How It Really Works*. *Cell Metab*, 2016. **24**(3): p. 361-364.
31. Seoane-Collazo, P., et al., *Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis*. *Endocrine*, 2015. **50**(2): p. 276-91.
32. Kim, K.S., R.J. Seeley, and D.A. Sandoval, *Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis*. *Nat Rev Neurosci*, 2018. **19**(4): p. 185-196.
33. Gangarossa, G. and S. Luquet, *Hypothalamic Regulation of Glucose Homeostasis: Is the Answer in the Matrix?* *Cell Metab*, 2020. **32**(5): p. 701-703.
34. Garcia-Caceres, C., et al., *Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism*. *Nat Neurosci*, 2019. **22**(1): p. 7-14.
35. Rahmouni, K., *Cardiovascular Regulation by the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus: Neurocircuitry and Signaling Systems*. *Hypertension*, 2016. **67**(6): p. 1064-71.
36. Timper, K. and J.C. Bruning, *Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity*. *Dis Model Mech*, 2017. **10**(6): p. 679-689.
37. Schneeberger, M., R. Gomis, and M. Claret, *Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance*. *J Endocrinol*, 2014. **220**(2): p. T25-46.
38. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Obesity and the regulation of energy balance*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 531-43.
39. Williams, K.W. and J.K. Elmquist, *From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(10): p. 1350-5.
40. Foster-Schubert, K.E. and D.E. Cummings, *Emerging therapeutic strategies for obesity*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(7): p. 779-93.
41. Everitt, B.J. and T. Hokfelt, *Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus*. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 1990. **47**: p. 1-15.
42. Lopez, M., M. Tena-Sempere, and C. Dieguez, *Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes)*. *Front Neuroendocrinol*, 2010. **31**(2): p. 113-27.
43. Kalsbeek, A., et al., *Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1212**: p. 114-29.
44. Simpson, K.A., N.M. Martin, and S.R. Bloom, *Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009. **53**(2): p. 120-8.
45. Wen, S., et al., *An overview of energy and metabolic regulation*. *Sci China Life Sci*, 2019. **62**(6): p. 771-790.
46. Barsh, G.S. and M.W. Schwartz, *Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(8): p. 589-600.

47. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
48. Marks, J.L., et al., *Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization*. Endocrinology, 1990. **127**(6): p. 3234-6.
49. Wang, J. and K.L. Leibowitz, *Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats*. Brain Res, 1997. **777**(1-2): p. 231-6.
50. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
51. Kamegai, J., et al., *Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2438-43.
52. Kristensen, P., et al., *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*. Nature, 1998. **393**(6680): p. 72-6.
53. Elias, C.F., et al., *Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area*. Neuron, 1999. **23**(4): p. 775-86.
54. Shintani, M., et al., *Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway*. Diabetes, 2001. **50**(2): p. 227-32.
55. Palkovits, M., *Hypothalamic regulation of food intake*. Ideggyogy Sz, 2003. **56**(9-10): p. 288-302.
56. Shimogawa, Y., Y. Sakuma, and K. Yamanouchi, *Efferent and afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus determined by neural tracer analysis: implications for lordosis regulation in female rats*. Neurosci Res, 2015. **91**: p. 19-33.
57. Majdic, G., et al., *Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 607-14.
58. Elmquist, J.K., et al., *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 741-6.
59. Lyons, W.E., et al., *Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15239-44.
60. Xu, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor*. Nat Neurosci, 2003. **6**(7): p. 736-42.
61. Komori, T., et al., *Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus*. Neuroscience, 2006. **139**(3): p. 1107-15.
62. Rios, M., et al., *Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(10): p. 1748-57.
63. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
64. Lopez, M., et al., *Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance*. Nat Med, 2010. **16**(9): p. 1001-8.
65. Dimicco, J.A. and D.V. Zaretsky, *The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(1): p. R47-63.
66. Bernardis, L.L. and L.L. Bellinger, *The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update*. Brain Res, 1987. **434**(3): p. 321-81.
67. Kalra, S.P., et al., *Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight*. Endocr Rev, 1999. **20**(1): p. 68-100.
68. Guan, X.M., et al., *Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice*. Neuroreport, 1998. **9**(15): p. 3415-9.

69. Thompson, R.H., N.S. Canteras, and L.W. Swanson, *Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat*. J Comp Neurol, 1996. **376**(1): p. 143-73.
70. Bi, S., B.M. Robinson, and T.H. Moran, *Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(5): p. R1030-6.
71. Yang, L., et al., *Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance*. J Neurosci, 2009. **29**(1): p. 179-90.
72. Bi, S., Y.J. Kim, and F. Zheng, *Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control*. Neuropeptides, 2012. **46**(6): p. 309-14.
73. Zhang, C., et al., *The dorsomedial hypothalamus and nucleus of the solitary tract as key regulators in a rat model of chronic obesity*. Brain Res, 2020. **1727**: p. 146538.
74. Cone, R.D., *Anatomy and regulation of the central melanocortin system*. Nat Neurosci, 2005. **8**(5): p. 571-8.
75. Sutton, A.K., et al., *Control of food intake and energy expenditure by Nos1 neurons of the paraventricular hypothalamus*. J Neurosci, 2014. **34**(46): p. 15306-18.
76. Anand, B.K. and J.R. Brobeck, *Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat*. Proc Soc Exp Biol Med, 1951. **77**(2): p. 323-4.
77. Kenny, P.J., *Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(11): p. 638-51.
78. Sakurai, T., et al., *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior*. Cell, 1998. **92**(5): p. 1 page following 696.
79. Lopez, M., et al., *Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(1): p. 41-5.
80. Yamanaka, A., et al., *Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor*. J Neurosci, 2010. **30**(38): p. 12642-52.
81. Nixon, J.P., et al., *Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins*. Handb Exp Pharmacol, 2012(209): p. 77-109.
82. Tupone, D., et al., *An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis*. J Neurosci, 2011. **31**(44): p. 15944-55.
83. Ferno, J., et al., *Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **418 Pt 1**: p. 17-26.
84. Drel, V.R., et al., *The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3335-43.
85. Qu, D., et al., *A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour*. Nature, 1996. **380**(6571): p. 243-7.
86. Imbernon, M., et al., *Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways*. Gastroenterology, 2013. **144**(3): p. 636-649 e6.
87. Cheng, S.Y., J.L. Leonard, and P.J. Davis, *Molecular aspects of thyroid hormone actions*. Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 139-70.
88. Ludwig, D.S., et al., *Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 379-86.
89. Messina, M.M. and J.M. Overton, *Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone*. Regul Pept, 2007. **139**(1-3): p. 23-30.
90. Mitrofanis, J., *Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta*. Neuroscience, 2005. **130**(1): p. 1-15.
91. Bonnavion, P., et al., *Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour*. J Physiol, 2016. **594**(22): p. 6443-6462.

92. Stuber, G.D. and R.A. Wise, *Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward*. Nat Neurosci, 2016. **19**(2): p. 198-205.
93. Petrovich, G.D., *Lateral Hypothalamus as a Motivation-Cognition Interface in the Control of Feeding Behavior*. Front Syst Neurosci, 2018. **12**: p. 14.
94. Bracey, E.F. and D. Burdakov, *Fast sensory representations in the lateral hypothalamus and their roles in brain function*. Physiol Behav, 2020. **222**: p. 112952.
95. Gutierrez, R., E. Fonseca, and S.A. Simon, *The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(18): p. 3469-3502.
96. Jennings, J.H., et al., *The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding*. Science, 2013. **341**(6153): p. 1517-21.
97. Navarro, M., et al., *Lateral Hypothalamus GABAergic Neurons Modulate Consummatory Behaviors Regardless of the Caloric Content or Biological Relevance of the Consumed Stimuli*. Neuropsychopharmacology, 2016. **41**(6): p. 1505-12.
98. Nieh, E.H., et al., *Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation*. Neuron, 2016. **90**(6): p. 1286-1298.
99. Palmiter, R.D., *Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior?* Trends Neurosci, 2007. **30**(8): p. 375-81.
100. Wang, G.J., N.D. Volkow, and J.S. Fowler, *The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity*. Expert Opin Ther Targets, 2002. **6**(5): p. 601-9.
101. Figueira, C., et al., *Hypothalamic dopamine signaling regulates brown fat thermogenesis*. Nat Metab, 2019. **1**(8): p. 811-829.
102. Klein, M.O., et al., *Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases*. Cell Mol Neurobiol, 2019. **39**(1): p. 31-59.
103. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 182-217.
104. Fetisov, S.O., et al., *Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(4): p. R905-10.
105. Mirmohammadsadeghi, Z., et al., *Role of paraventricular hypothalamic dopaminergic D1 receptors in food intake regulation of food-deprived rats*. Eur J Pharmacol, 2018. **818**: p. 43-49.
106. Zhu, X., D. Ottenheimer, and R.J. DiLeone, *Activity of D1/2 Receptor Expressing Neurons in the Nucleus Accumbens Regulates Running, Locomotion, and Food Intake*. Front Behav Neurosci, 2016. **10**: p. 66.
107. Land, B.B., et al., *Medial prefrontal D1 dopamine neurons control food intake*. Nat Neurosci, 2014. **17**(2): p. 248-53.
108. Johnson, P.M. and P.J. Kenny, *Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats*. Nat Neurosci, 2010. **13**(5): p. 635-41.
109. Volkow, N.D., G.J. Wang, and R.D. Baler, *Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity*. Trends Cogn Sci, 2011. **15**(1): p. 37-46.
110. Cope, M.B., et al., *Antipsychotic drug-induced weight gain: development of an animal model*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(6): p. 607-14.
111. Henderson, D.C., et al., *Pathophysiological mechanisms of increased cardiometabolic risk in people with schizophrenia and other severe mental illnesses*. Lancet Psychiatry, 2015. **2**(5): p. 452-464.
112. Wang, G.J., et al., *Brain dopamine and obesity*. Lancet, 2001. **357**(9253): p. 354-7.
113. Holt, R.I., A.H. Barnett, and C.J. Bailey, *Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12**(12): p. 1048-57.
114. Fu, B.M., *Transport Across the Blood-Brain Barrier*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1097**: p. 235-259.

115. Weindl, A. and R.J. Joynt, *Barrier properties of the subcommissural organ*. Arch Neurol, 1973. **29**(1): p. 16-22.
116. Ganong, W.F., *Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(5-6): p. 422-7.
117. Woods, S.C. and D. Porte, Jr., *Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs*. Am J Physiol, 1977. **233**(4): p. E331-4.
118. Havrankova, J., M. Brownstein, and J. Roth, *Insulin and insulin receptors in rodent brain*. Diabetologia, 1981. **20 Suppl**: p. 268-73.
119. Banks, W.A., et al., *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. Peptides, 1996. **17**(2): p. 305-11.
120. Pardridge, W.M., D. Triguero, and C.R. Farrell, *Downregulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes*. Diabetes, 1990. **39**(9): p. 1040-4.
121. Lam, T.K., G.J. Schwartz, and L. Rossetti, *Hypothalamic sensing of fatty acids*. Nat Neurosci, 2005. **8**(5): p. 579-84.
122. Hawkins, R.A., et al., *Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids*. J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 218S-26S.
123. Kastin, A.J. and V. Akerstrom, *Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain*. Peptides, 2000. **21**(5): p. 679-82.
124. Schaeffer, M., et al., *Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1512-7.
125. Balland, E., et al., *Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain*. Cell Metab, 2014. **19**(2): p. 293-301.
126. Collden, G., et al., *Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin*. Mol Metab, 2015. **4**(1): p. 15-24.
127. Prevot, V., R. Nogueiras, and M. Schwaninger, *Tanycytes in the infundibular nucleus and median eminence and their role in the blood-brain barrier*. Handb Clin Neurol, 2021. **180**: p. 253-273.
128. Langlet, F., *Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus*. J Neuroendocrinol, 2014. **26**(11): p. 753-60.
129. Wagner, H.J. and C. Pilgrim, *Extracellular and transcellular transport of horseradish peroxidase (HRP) through the hypothalamic tanycyte ependyma*. Cell Tissue Res, 1974. **152**(4): p. 477-91.
130. Vallet, P.G., et al., *Colocalization of delta sleep inducing peptide and luteinizing hormone releasing hormone in neurosecretory vesicles in rat median eminence*. Neuroendocrinology, 1991. **53**(1): p. 103-6.
131. Lichtensteiger, W., J.G. Richards, and H.G. Kopp, *Changes in the distribution of non-neuronal elements in rat median eminence and in anterior pituitary hormone secretion after activation of tuberoinfundibular dopamine neurones by brain stimulation or nicotine*. Brain Res, 1978. **157**(1): p. 73-88.
132. Langlet, F., et al., *Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting*. Cell Metab, 2013. **17**(4): p. 607-17.
133. Langlet, F., et al., *Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain*. J Comp Neurol, 2013. **521**(15): p. 3389-405.
134. Hofmann, K., et al., *Tanycytes and a differential fatty acid metabolism in the hypothalamus*. Glia, 2017. **65**(2): p. 231-249.
135. Haddad-Tovolli, R., et al., *Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 224.
136. Liebner, S., et al., *Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease*. Acta Neuropathol, 2018. **135**(3): p. 311-336.

137. Elizondo-Vega, R.J., A. Recabal, and K. Oyarce, *Nutrient Sensing by Hypothalamic Tanycytes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 244.
138. Berry, D.C., et al., *The developmental origins of adipose tissue*. Development, 2013. **140**(19): p. 3939-49.
139. Chusyd, D.E., et al., *Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots*. Front Nutr, 2016. **3**: p. 10.
140. Choe, S.S., et al., *Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 30.
141. Cinti, S., *Adipose Organ Development and Remodeling*. Compr Physiol, 2018. **8**(4): p. 1357-1431.
142. Rodgers, A. and A.N. Sferruzzi-Perri, *Developmental programming of offspring adipose tissue biology and obesity risk*. Int J Obes (Lond), 2021.
143. Luo, L. and M. Liu, *Adipose tissue in control of metabolism*. J Endocrinol, 2016. **231**(3): p. R77-R99.
144. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 1-11.
145. Shi, H. and D.J. Clegg, *Sex differences in the regulation of body weight*. Physiol Behav, 2009. **97**(2): p. 199-204.
146. Rodgers, A. and A.N. Sferruzzi-Perri, *Developmental programming of offspring adipose tissue biology and obesity risk*. Int J Obes (Lond), 2021. **45**(6): p. 1170-1192.
147. Vegiopoulos, A., M. Rohm, and S. Herzig, *Adipose tissue: between the extremes*. EMBO J, 2017. **36**(14): p. 1999-2017.
148. Flier, J.S., et al., *Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity*. Science, 1987. **237**(4813): p. 405-8.
149. Siiteri, P.K., *Adipose tissue as a source of hormones*. Am J Clin Nutr, 1987. **45**(1 Suppl): p. 277-82.
150. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
151. Zhang, Y. and S. Chua, Jr., *Leptin Function and Regulation*. Compr Physiol, 2017. **8**(1): p. 351-369.
152. Friedman, J.M., *Leptin and the endocrine control of energy balance*. Nat Metab, 2019. **1**(8): p. 754-764.
153. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
154. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Leptin*. Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 413-37.
155. de Luca, C., et al., *Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3484-93.
156. Frederich, R.C., et al., *Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1311-4.
157. Cohen, S.L., et al., *Human leptin characterization*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 589.
158. Fernandez-Formoso, G., et al., *Leptin, 20 years of searching for glucose homeostasis*. Life Sci, 2015. **140**: p. 4-9.
159. Chan, J.L., et al., *The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1409-21.
160. Klein, S., et al., *Leptin production during early starvation in lean and obese women*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(2): p. E280-4.
161. Klok, M.D., S. Jakobsdottir, and M.L. Drent, *The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review*. Obes Rev, 2007. **8**(1): p. 21-34.
162. Elmquist, J.K., et al., *Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin*. Nat Neurosci, 1998. **1**(6): p. 445-50.

163. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 903-8.
164. Farooqi, I.S., et al., *Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency*. N Engl J Med, 1999. **341**(12): p. 879-84.
165. Chua, S.C., Jr., et al., *Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor*. Science, 1996. **271**(5251): p. 994-6.
166. Zhang, C., et al., *Tat-modified leptin is more accessible to hypothalamus through brain-blood barrier with a significant inhibition of body-weight gain in high-fat-diet fed mice*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010. **118**(1): p. 31-7.
167. Jung, C.H. and M.S. Kim, *Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity*. Arch Pharm Res, 2013. **36**(2): p. 201-7.
168. Fenzl, A. and F.W. Kiefer, *Brown adipose tissue and thermogenesis*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014. **19**(1): p. 25-37.
169. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
170. Sacks, H. and M.E. Symonds, *Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 1783-90.
171. Contreras, C., et al., *The brain and brown fat*. Ann Med, 2015. **47**(2): p. 150-68.
172. Tank, A.W. and D. Lee Wong, *Peripheral and central effects of circulating catecholamines*. Compr Physiol, 2015. **5**(1): p. 1-15.
173. Fuller-Jackson, J.P. and B.A. Henry, *Adipose and skeletal muscle thermogenesis: studies from large animals*. J Endocrinol, 2018. **237**(3): p. R99-R115.
174. Nam, D., et al., *The adipocyte clock controls brown adipogenesis through the TGF-beta and BMP signaling pathways*. J Cell Sci, 2015. **128**(9): p. 1835-47.
175. Villarroya, F., et al., *Brown adipose tissue as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(1): p. 26-35.
176. Scheele, C. and C. Wolfrum, *Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism*. Endocr Rev, 2020. **41**(1).
177. Fisher, F.M., et al., *FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis*. Genes Dev, 2012. **26**(3): p. 271-81.
178. Hondares, E., et al., *Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat*. Cell Metab, 2010. **11**(3): p. 206-12.
179. Kharitonov, A., et al., *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1627-35.
180. Canto, C. and J. Auwerx, *PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 98-105.
181. Hondares, E., et al., *Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue*. Metabolism, 2014. **63**(3): p. 312-7.
182. Cairo, M. and J. Villarroya, *The role of autophagy in brown and beige adipose tissue plasticity*. J Physiol Biochem, 2020. **76**(2): p. 213-226.
183. Nicholls, D.G., *The hunt for the molecular mechanism of brown fat thermogenesis*. Biochimie, 2017. **134**: p. 9-18.
184. Aquila, H., T.A. Link, and M. Klingenberg, *The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane*. EMBO J, 1985. **4**(9): p. 2369-76.
185. Lin, C.S. and M. Klingenberg, *Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria*. FEBS Lett, 1980. **113**(2): p. 299-303.

186. Hanssen, M.J., et al., *Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus*. Nat Med, 2015. **21**(8): p. 863-5.
187. Ouellet, V., et al., *Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 545-52.
188. Yoneshiro, T., et al., *Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(1): p. 13-6.
189. Yoneshiro, T., et al., *Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(9): p. 1755-60.
190. Giralt, M. and F. Villarroya, *White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?* Endocrinology, 2013. **154**(9): p. 2992-3000.
191. Benador, I.Y., et al., *Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 869-885 e6.
192. Roh, H.C., et al., *Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity*. Cell Metab, 2018. **27**(5): p. 1121-1137 e5.
193. Ikeda, K., P. Maretich, and S. Kajimura, *The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes*. Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(3): p. 191-200.
194. Singh, A.M. and S. Dalton, *What Can 'Brown-ing' Do For You?* Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(5): p. 349-359.
195. Lidell, M.E., et al., *Evidence for two types of brown adipose tissue in humans*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 631-4.
196. Wu, J., et al., *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
197. Sharp, L.Z., et al., *Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49452.
198. Shinoda, K., et al., *Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes*. Nat Med, 2015. **21**(4): p. 389-94.
199. Leitner, B.P., et al., *Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(32): p. 8649-8654.
200. Cypess, A.M., et al., *Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 635-9.
201. Xue, R., et al., *Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 760-8.
202. Wang, Q.A., et al., *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1338-44.
203. Lee, Y.H., et al., *Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice*. FASEB J, 2015. **29**(1): p. 286-99.
204. Barbatelli, G., et al., *The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(6): p. E1244-53.
205. Xue, B., et al., *Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8311-22.
206. Ukropec, J., et al., *UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1<sup>-/-</sup> mice*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31894-908.
207. Roesler, A. and L. Kazak, *UCP1-independent thermogenesis*. Biochem J, 2020. **477**(3): p. 709-725.
208. Chang, S.H., et al., *Mechanisms underlying UCP1 dependent and independent adipocyte thermogenesis*. Obes Rev, 2019. **20**(2): p. 241-251.

209. Ikeda, K. and T. Yamada, *UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 498.
210. Chouchani, E.T., L. Kazak, and B.M. Spiegelman, *New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond*. Cell Metab, 2019. **29**(1): p. 27-37.
211. Nishimura, T., et al., *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1492**(1): p. 203-6.
212. Muise, E.S., et al., *Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(2): p. 403-12.
213. Inagaki, T., et al., *Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 415-25.
214. Badman, M.K., et al., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 426-37.
215. Galman, C., et al., *The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man*. Cell Metab, 2008. **8**(2): p. 169-74.
216. Suzuki, M., et al., *betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(4): p. 1006-14.
217. Kurosu, H., et al., *Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 26687-26695.
218. Kharitonkov, A., et al., *FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 1-7.
219. Ogawa, Y., et al., *BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7432-7.
220. Ito, S., et al., *Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein*. Mech Dev, 2000. **98**(1-2): p. 115-9.
221. Lu, W., X. Li, and Y. Luo, *FGF21 in obesity and cancer: New insights*. Cancer Lett, 2021. **499**: p. 5-13.
222. Coskun, T., et al., *Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice*. Endocrinology, 2008. **149**(12): p. 6018-27.
223. Xu, J., et al., *Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 250-9.
224. Berglund, E.D., et al., *Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity*. Endocrinology, 2009. **150**(9): p. 4084-93.
225. Woo, Y.C., et al., *Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives*. Clin Endocrinol (Oxf), 2013. **78**(4): p. 489-96.
226. Fisher, F.M. and E. Maratos-Flier, *Understanding the Physiology of FGF21*. Annu Rev Physiol, 2016. **78**: p. 223-41.
227. Tezze, C., V. Romanello, and M. Sandri, *FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 419.
228. Kliewer, S.A. and D.J. Mangelsdorf, *Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(1): p. 254S-257S.
229. Gavalda-Navarro, A., et al., *Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13717.
230. Kharitonkov, A. and R. DiMarchi, *Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field*. J Intern Med, 2017. **281**(3): p. 233-246.
231. Badman, M.K., et al., *Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 4931-40.

232. Fisher, F.M., et al., *Fibroblast growth factor 21 limits lipotoxicity by promoting hepatic fatty acid activation in mice on methionine and choline-deficient diets*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(5): p. 1073-83 e6.
233. Mai, K., et al., *Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing fibroblast growth factor-21*. *Diabetes*, 2009. **58**(7): p. 1532-8.
234. Rando, G., et al., *Glucocorticoid receptor-PPARalpha axis in fetal mouse liver prepares neonates for milk lipid catabolism*. *Elife*, 2016. **5**.
235. Sa-Nguanmoo, P., N. Chattipakorn, and S.C. Chattipakorn, *Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain*. *Metab Brain Dis*, 2016. **31**(2): p. 239-48.
236. Lin, W., et al., *Advances in Biological Functions and Clinical Studies of FGF21*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021. **14**: p. 3281-3290.
237. Hsuchou, H., W. Pan, and A.J. Kastin, *The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood*. *Peptides*, 2007. **28**(12): p. 2382-6.
238. Geller, S., et al., *Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion*. *Cell Metab*, 2019. **30**(4): p. 833-844 e7.
239. Torres-Castro, P., et al., *Modulation of the Systemic Immune Response in Suckling Rats by Breast Milk TGF-beta2, EGF and FGF21 Supplementation*. *Nutrients*, 2020. **12**(6).
240. Torres-Castro, P., et al., *TGF-beta2, EGF, and FGF21 Growth Factors Present in Breast Milk Promote Mesenteric Lymph Node Lymphocytes Maturation in Suckling Rats*. *Nutrients*, 2018. **10**(9).
241. Giralt, M., A. Gavalda-Navarro, and F. Villarroya, *Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015. **418 Pt 1**: p. 66-73.
242. Victora, C.G., et al., *Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect*. *Lancet*, 2016. **387**(10017): p. 475-90.
243. Acevedo, N., et al., *Perinatal and Early-Life Nutrition, Epigenetics, and Allergy*. *Nutrients*, 2021. **13**(3).
244. Sherwood, W.B., et al., *Duration of breastfeeding is associated with leptin (LEP) DNA methylation profiles and BMI in 10-year-old children*. *Clin Epigenetics*, 2019. **11**(1): p. 128.
245. Vizzari, G., et al., *Human Milk, More Than Simple Nourishment*. *Children (Basel)*, 2021. **8**(10).
246. Rito, A.I., et al., *Association between Characteristics at Birth, Breastfeeding and Obesity in 22 Countries: The WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative - COSI 2015/2017*. *Obes Facts*, 2019. **12**(2): p. 226-243.
247. Organization, W.H. *Global Targets 2025 To improve maternal, infant and young child nutrition*. 2014; Available from: [https://www.who.int/nutrition/topics/nutrition\\_globaltargets2025/en/](https://www.who.int/nutrition/topics/nutrition_globaltargets2025/en/).
248. Nommsen, L.A., et al., *Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study*. *Am J Clin Nutr*, 1991. **53**(2): p. 457-65.
249. Nielsen, S.B., et al., *Adequacy of milk intake during exclusive breastfeeding: a longitudinal study*. *Pediatrics*, 2011. **128**(4): p. e907-14.
250. Gidrewicz, D.A. and T.R. Fenton, *A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk*. *BMC Pediatr*, 2014. **14**: p. 216.
251. Galante, L., et al., *Preterm human milk: associations between perinatal factors and hormone concentrations throughout lactation*. *Pediatr Res*, 2021. **89**(6): p. 1461-1469.
252. Di Benedetto, M.G., et al., *Nutritional and immunological factors in breast milk: A role in the intergenerational transmission from maternal psychopathology to child development*. *Brain Behav Immun*, 2020. **85**: p. 57-68.
253. Suwaydi, M.A., et al., *Human Milk Metabolic Hormones: Analytical Methods and Current Understanding*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).

254. Chan, D., 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 (Lond)*, 2018. **42**(1): p. 36-43.
255. Lind, M.V., et al., *Breastfeeding, Breast Milk Composition, and Growth Outcomes*. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 2018. **89**: p. 63-77.
256. Mazzocchi, A., et al., *Hormones in Breast Milk and Effect on Infants' Growth: A Systematic Review*. *Nutrients*, 2019. **11**(8).
257. Savino, F., et al., *Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants*. *Eur J Clin Nutr*, 2010. **64**(9): p. 972-7.
258. Bronsky, J., et al., *Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk*. *Clin Chem*, 2006. **52**(9): p. 1763-70.
259. Martin, L.J., et al., *Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(5): p. 1106-11.
260. Newburg, D.S., J.G. Woo, and A.L. Morrow, *Characteristics and potential functions of human milk adiponectin*. *J Pediatr*, 2010. **156**(2 Suppl): p. S41-6.
261. Savino, F., et al., *Adiponectin in breast milk: relation to serum adiponectin concentration in lactating mothers and their infants*. *Acta Paediatr*, 2012. **101**(10): p. 1058-62.
262. Woo, J.G., et al., *Human milk adiponectin affects infant weight trajectory during the second year of life*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. **54**(4): p. 532-9.
263. Fakhreldin, A.R., *Maternal and Infantile Adiponectin as Marker for Anthropometric Parameters of Lactating Mothers and their Breast-Fed Infants*. *Indian J Endocrinol Metab*, 2018. **22**(1): p. 16-22.
264. Galante, L., et al., *Growth Factor Concentrations in Human Milk Are Associated With Infant Weight and BMI From Birth to 5 Years*. *Front Nutr*, 2020. **7**: p. 110.
265. Mohamad, M., et al., *Maternal Serum and Breast Milk Adiponectin: The Association with Infant Adiposity Development*. *Int J Environ Res Public Health*, 2018. **15**(6).
266. Casabiell, X., et al., *Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(12): p. 4270-3.
267. Savino, F., et al., *Advances on human milk hormones and protection against obesity*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2013. **59**(1): p. 89-98.
268. Galante, L., et al., *Metabolic Hormone Profiles in Breast Milk From Mothers of Moderate-Late Preterm Infants Are Associated With Growth From Birth to 4 Months in a Sex-Specific Manner*. *Front Nutr*, 2021. **8**: p. 641227.
269. Savino, F., et al., *Looking for a relation between serum leptin concentration and body composition parameters in healthy term infants in the first 6 months of life*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008. **46**(3): p. 348-51.
270. Schuster, S., et al., *Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation*. *Pediatr Res*, 2011. **70**(6): p. 633-7.
271. Miralles, O., et al., *A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. **14**(8): p. 1371-7.
272. Armstrong, J., J.J. Reilly, and T. Child Health Information, *Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity*. *Lancet*, 2002. **359**(9322): p. 2003-4.
273. Gillman, M.W., et al., *Risk of overweight among adolescents who were breastfed as infants*. *JAMA*, 2001. **285**(19): p. 2461-7.
274. von Kries, R., et al., *Breast feeding and obesity: cross sectional study*. *BMJ*, 1999. **319**(7203): p. 147-50.

275. Cannon, A.M., et al., *The Effects of Leptin on Breastfeeding Behaviour*. Int J Environ Res Public Health, 2015. **12**(10): p. 12340-55.
276. Palou, M., C. Pico, and A. Palou, *Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity*. Nutr Rev, 2018. **76**(12): p. 875-892.
277. Stocker, C.J. and M.A. Cawthorne, *The influence of leptin on early life programming of obesity*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(10): p. 545-51.
278. Pico, C., et al., *The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(8): p. 1199-209.
279. Sanchez, J., et al., *Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life*. Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 733-40.
280. Koldovsky, O., *Hormones in milk*. Vitam Horm, 1995. **50**: p. 77-149.
281. Kulski, J.K. and P.E. Hartmann, *Milk insulin, GH and TSH: relationship to changes in milk lactose, glucose and protein during lactogenesis in women*. Endocrinol Exp, 1983. **17**(3-4): p. 317-26.
282. Lucas, A., et al., *Metabolic and endocrine responses to a milk feed in six-day-old term infants: differences between breast and cow's milk formula feeding*. Acta Paediatr Scand, 1981. **70**(2): p. 195-200.
283. Odeleye, O.E., et al., *Fasting hyperinsulinemia is a predictor of increased body weight gain and obesity in Pima Indian children*. Diabetes, 1997. **46**(8): p. 1341-5.
284. Fields, D.A. and E.W. Demerath, *Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition*. Pediatr Obes, 2012. **7**(4): p. 304-12.
285. Fields, D.A., et al., *Associations between human breast milk hormones and adipocytokines and infant growth and body composition in the first 6 months of life*. Pediatr Obes, 2017. **12** Suppl 1: p. 78-85.
286. Kierson, J.A., et al., *Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk*. Acta Paediatr, 2006. **95**(8): p. 991-5.
287. Aydin, S., et al., *Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk*. Peptides, 2006. **27**(4): p. 878-82.
288. Ilcol, Y.O. and B. Hizli, *Active and total ghrelin concentrations increase in breast milk during lactation*. Acta Paediatr, 2007. **96**(11): p. 1632-9.
289. Savino, F., et al., *Assay of ghrelin concentration in infant formulas and breast milk*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(15): p. 1971-5.
290. Velasco, I., et al., *Bioactive Components in Human Milk Along the First Month of Life: Effects of Iodine Supplementation during Pregnancy*. Ann Nutr Metab, 2016. **68**(2): p. 130-6.
291. Kramer, M.S., *Do breast-feeding and delayed introduction of solid foods protect against subsequent obesity?* J Pediatr, 1981. **98**(6): p. 883-7.
292. Beyerlein, A. and R. von Kries, *Breastfeeding and body composition in children: will there ever be conclusive empirical evidence for a protective effect against overweight?* Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6 Suppl): p. 1772S-1775S.
293. McCance, R.A., *Food, growth, and time*. Lancet, 1962. **2**(7258): p. 671-6.
294. Arenz, S., et al., *Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(10): p. 1247-56.
295. Owen, C.G., et al., *Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence*. Pediatrics, 2005. **115**(5): p. 1367-77.
296. Owen, C.G., et al., *The effect of breastfeeding on mean body mass index throughout life: a quantitative review of published and unpublished observational evidence*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(6): p. 1298-307.

297. Zhang, J., et al., *Birth weight, growth and feeding pattern in early infancy predict overweight/obesity status at two years of age: a birth cohort study of Chinese infants*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e64542.
298. Harder, T., et al., *Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis*. Am J Epidemiol, 2005. **162**(5): p. 397-403.
299. de Armas, M.G., et al., [*Importance of breastfeeding in the prevalence of metabolic syndrome and degree of childhood obesity*]. Endocrinol Nutr, 2009. **56**(8): p. 400-3.
300. Hornell, A., et al., *Breastfeeding, introduction of other foods and effects on health: a systematic literature review for the 5th Nordic Nutrition Recommendations*. Food Nutr Res, 2013. **57**.
301. Verstraete, S.G., M.B. Heyman, and J.M. Wojcicki, *Breastfeeding offers protection against obesity in children of recently immigrated Latina women*. J Community Health, 2014. **39**(3): p. 480-6.
302. Choi, S.R., et al., *Association Between Duration of Breast Feeding and Metabolic Syndrome: The Korean National Health and Nutrition Examination Surveys*. J Womens Health (Larchmt), 2017. **26**(4): p. 361-367.
303. McCrory, C. and R. Layte, *Breastfeeding and risk of overweight and obesity at nine-years of age*. Soc Sci Med, 2012. **75**(2): p. 323-30.
304. Palaska, E., et al., *Association Between Breastfeeding and Obesity in Preschool Children*. Mater Sociomed, 2020. **32**(2): p. 117-122.
305. Tahir, M.J., et al., *Associations of breastfeeding or formula feeding with infant anthropometry and body composition at 6 months*. Matern Child Nutr, 2021. **17**(2): p. e13105.
306. Appleton, J., et al., *Infant formula feeding practices associated with rapid weight gain: A systematic review*. Matern Child Nutr, 2018. **14**(3): p. e12602.
307. Durmus, B., et al., *General and abdominal fat outcomes in school-age children associated with infant breastfeeding patterns*. Am J Clin Nutr, 2014. **99**(6): p. 1351-8.
308. Corvalan, C., et al., *Impact of growth patterns and early diet on obesity and cardiovascular risk factors in young children from developing countries*. Proc Nutr Soc, 2009. **68**(3): p. 327-37.
309. Gonzalez, D.A., A. Nazmi, and C.G. Victora, *Growth from birth to adulthood and abdominal obesity in a Brazilian birth cohort*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(1): p. 195-202.
310. Miharshahi, S., et al., *Determinants of rapid weight gain during infancy: baseline results from the NOURISH randomised controlled trial*. BMC Pediatr, 2011. **11**: p. 99.
311. Durmus, B., et al., *Breast-feeding and growth in children until the age of 3 years: the Generation R Study*. Br J Nutr, 2011. **105**(11): p. 1704-11.
312. Butte, N.F., *Impact of infant feeding practices on childhood obesity*. J Nutr, 2009. **139**(2): p. 412S-6S.
313. Novaes, J.F., et al., *Breastfeeding and obesity in Brazilian children*. Eur J Public Health, 2012. **22**(3): p. 383-9.
314. Jiang, M. and E.M. Foster, *Duration of breastfeeding and childhood obesity: a generalized propensity score approach*. Health Serv Res, 2013. **48**(2 Pt 1): p. 628-51.
315. Bammann, K., et al., *Early life course risk factors for childhood obesity: the IDEFICS case-control study*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e86914.
316. Venturelli, F., et al., *The effect of Public Health/Pediatric Obesity interventions on socioeconomic inequalities in childhood obesity: A scoping review*. Obes Rev, 2019. **20**(12): p. 1720-1739.
317. Heslehurst, N., et al., *The impact of maternal BMI status on pregnancy outcomes with immediate short-term obstetric resource implications: a meta-analysis*. Obes Rev, 2008. **9**(6): p. 635-83.
318. Nelson, S.M., P. Matthews, and L. Poston, *Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 255-75.

319. Poston, L., et al., *Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement*. *Pediatr Res*, 2011. **69**(2): p. 175-80.
320. Norman, J.E. and R.M. Reynolds, *The consequences of obesity and excess weight gain in pregnancy*. *Proc Nutr Soc*, 2011. **70**(4): p. 450-6.
321. Voerman, E., et al., *Maternal body mass index, gestational weight gain, and the risk of overweight and obesity across childhood: An individual participant data meta-analysis*. *PLoS Med*, 2019. **16**(2): p. e1002744.
322. Litvak, J., N. Parekh, and A. Deierlein, *Prenatal dietary exposures and offspring body size from 6 months to 18 years: A systematic review*. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2020. **34**(2): p. 171-189.
323. Taylor, P.D., A.M. Samuelsson, and L. Poston, *Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014. **210**(3): p. 508-23.
324. Crume, T.L., et al., *Long-term impact of neonatal breastfeeding on childhood adiposity and fat distribution among children exposed to diabetes in utero*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(3): p. 641-5.
325. Liang, X., et al., *Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 34345.
326. Tsuduki, T., et al., *High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2013. **59**(5): p. 384-92.
327. Butruille, L., et al., *Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring*. *Int J Obes (Lond)*, 2019. **43**(12): p. 2381-2393.
328. Vogt, M.C., et al., *Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding*. *Cell*, 2014. **156**(3): p. 495-509.
329. Lopez, M., et al., *A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat*. *Diabetologia*, 2005. **48**(1): p. 140-8.
330. Lopez, M., et al., *Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood*. *Int J Obes (Lond)*, 2007. **31**(2): p. 371-7.
331. Caron, E., et al., *Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function*. *J Neurosci*, 2012. **32**(33): p. 11486-94.
332. Ellsworth, L., et al., *Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity*. *Reproduction*, 2018. **156**(2): p. R23-R42.
333. Hafner, H., et al., *Lactational High-Fat Diet Exposure Programs Metabolic Inflammation and Bone Marrow Adiposity in Male Offspring*. *Nutrients*, 2019. **11**(6).
334. Oddy, W.H., et al., *Early infant feeding and adiposity risk: from infancy to adulthood*. *Ann Nutr Metab*, 2014. **64**(3-4): p. 262-70.
335. Peneau, S., S. Hercberg, and M.F. Rolland-Cachera, *Breastfeeding, early nutrition, and adult body fat*. *J Pediatr*, 2014. **164**(6): p. 1363-8.
336. Saito, M., et al., *High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity*. *Diabetes*, 2009. **58**(7): p. 1526-31.
337. Orava, J., et al., *Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans*. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. **21**(11): p. 2279-87.
338. van Marken Lichtenbelt, W.D., et al., *Cold-activated brown adipose tissue in healthy men*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1500-8.
339. Betz, M.J. and S. Enerback, *Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease*. *Nat Rev Endocrinol*, 2018. **14**(2): p. 77-87.
340. Villarroya, F., et al., *Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology*. *Cell Metab*, 2018. **27**(5): p. 954-961.
341. Rachid, T.L., et al., *PPAR-alpha agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice*. *Cell Biochem Funct*, 2015. **33**(4): p. 249-56.

342. Cheshmeh, S., et al., *Effects of Breastfeeding and Formula Feeding on the Expression Level of FTO, CPT1A and PPAR-alpha Genes in Healthy Infants*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020. **13**: p. 2227-2237.
343. Peixoto, T.C., et al., *Early weaning alters the thermogenic capacity of brown adipose tissue in adult male and female rats*. *Eur J Nutr*, 2020. **59**(5): p. 2207-2218.
344. Geng, L., K.S.L. Lam, and A. Xu, *The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic*. *Nat Rev Endocrinol*, 2020. **16**(11): p. 654-667.
345. Richard, D., *Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity*. *Nat Rev Endocrinol*, 2015. **11**(8): p. 489-501.
346. Sullivan, E.L. and K.L. Grove, *Metabolic imprinting in obesity*. *Forum Nutr*, 2010. **63**: p. 186-194.
347. Gali Ramamoorthy, T., et al., *Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats*. *Int J Obes (Lond)*, 2018. **42**(8): p. 1431-1444.
348. Peixoto, T.C., et al., *Hypothalamic Neuropeptides Expression and Hypothalamic Inflammation in Adult Rats that Were Exposed to Tobacco Smoke during Breastfeeding: Sex-Related Differences*. *Neuroscience*, 2019. **418**: p. 69-81.
349. Bouret, S.G., *Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity*. *Int J Obes Suppl*, 2012. **2**(Suppl 2): p. S19-24.
350. Sun, X., S. Luquet, and D.M. Small, *DRD2: Bridging the Genome and Ingestive Behavior*. *Trends Cogn Sci*, 2017. **21**(5): p. 372-384.
351. Jensen-Cody, S.O., et al., *FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake*. *Cell Metab*, 2020. **32**(2): p. 273-286 e6.
352. Flippo, K.H., et al., *FGF21 signaling in glutamatergic neurons is required for weight loss associated with dietary protein dilution*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 19521.
353. Fang, X., et al., *FGF21 Protects Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Models Via Repression of Neuroinflammation*. *Neurotox Res*, 2020. **37**(3): p. 616-627.
354. Kilkenny, D.M. and J.V. Rocheleau, *The FGF21 Receptor Signaling Complex: Klothobeta, FGFR1c, and Other Regulatory Interactions*. *Vitam Horm*, 2016. **101**: p. 17-58.
355. Sonoda, J., M.Z. Chen, and A. Baruch, *FGF21-receptor agonists: an emerging therapeutic class for obesity-related diseases*. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2017. **30**(2).
356. Xu, C., et al., *KLB, encoding beta-Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism*. *EMBO Mol Med*, 2017. **9**(10): p. 1379-1397.
357. Lopez, M., et al., *Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance*. *Nat Rev Endocrinol*, 2016. **12**(7): p. 421-32.
358. Duquenne, M., et al., *Leptin brain entry via a tanycytic LepR-EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function*. *Nat Metab*, 2021. **3**(8): p. 1071-1090.

# ANEXOS

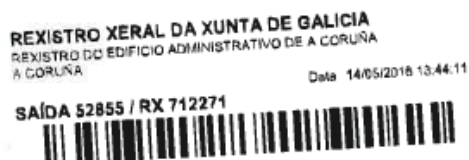


## ANEXO 1



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

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



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.

CM: h3BzRvYg1  
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>





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

Assinado por: RODRIGUEZ VAZQUEZ, MANUEL  
Cargo: XEFE TERRITORIAL  
Data e hora: 14/05/2018 08:48:39

CVE: H6EhcBnYg1  
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>



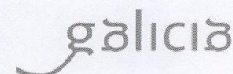
## ANEXO 2



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Avda. do Camiño Francés, 10, Baixo  
15703 Santiago de Compostela  
A Coruña

AGACAL  
Axencia Galega  
da Calidade Alimentaria



**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>PEÑA LEÓN</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>VERÓNICA LORENA</b>		DNI / DNI / Identity card number: <b>49890878Z</b>
1.3. Categoría / Categoría / Category: <b>"b"</b>	1.4. Especies / Especies / Species: <b>ROEDORES</b>	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: <b>2.04.2023</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>b381</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>20/02/2019</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature  <div style="text-align: center;">     <b>Asdo Manuel Rodríguez Vázquez</b>  <b>Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b> </div>		





**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "B" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "B"**

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

.....

**MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "B"**

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*



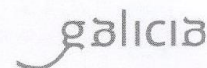
## ANEXO 3



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Avda. do Camiño Francés, 10. Baixo  
15703 Santiago de Compostela  
A Coruña

AGACAL  
Axencia Galega  
da Calidade Alimentaria



**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>PEÑA LEÓN</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>VERÓNICA LORENA</b>		DNI / DNI / Identity card number: <b>49890878Z</b>
1.3. Categoría/Categoría/Category: <b>"C"</b>	1.4. Especies/Especies/Species: <b>ROEDORES</b>	1.5. Válido ata/ válido hasta/expires: <b>2.04.2023</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>c421</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e endereço do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>20/02/2019</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature		
  <b>Asdo.: Manuel Rodríguez Vázquez Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b>		





**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "C" REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "C"**

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedementos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados ( 8 horas)*
- 6.- *Principios de cirurxía (5 horas)*

**MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "C"**

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedimientos minimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedimientos minimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedimientos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados ( 8 horas)*
- 6.- *Principios de cirugía (5 horas)*







Los eventos que tienen lugar en períodos tempranos de la vida podrían ser determinantes en el desarrollo de obesidad. Partiendo de un modelo animal de lactancia materna prolongada, investigamos si ésta provocaría cambios persistentes en el metabolismo. Los resultados indican que la lactancia prolongada activa la termogénesis del tejido adiposo marrón y el gasto energético en las crías. Estos efectos están mediados por el aumento en la producción hepática de FGF21, el cual activa las neuronas GABAérgicas que expresan el receptor 2 de la dopamina en el núcleo lateral hipotalámico y la zona incerta. Concluimos que la lactancia materna prolongada protege frente a la obesidad a través de cambios fisiológicos duraderos que involucran la comunicación entre hígado, hipotálamo y tejido adiposo marrón.