



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos

Efecto de un Paradigma de Ambiente Enriquecido en un Modelo Murino de Obesidad y Diabetes Tipo II

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

L.C.G. María del Sol Díaz de León Guerrero

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Leonor Pérez Martínez (IBT-UNAM)

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dra. Lourdes Massieu Trigo (IFC-UNAM)
Dr. Federico Sánchez Rodríguez (IBT-UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMITÉ JURADO

Dra. Hilda Lomelí Buyoli (IBT-UNAM)

Dr. Enrique Rudiño Piñera (IBT-UNAM)

Dr. Julio Morán Andrade (IFC-UNAM)

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina (IIB-UNAM)

Dr. José Luis Montiel Hernández (FF-UAEM)

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento de DGAPA-UNAM (IN209212 e IN227510) y CONACYT (155290 y 154542).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo y que me han acompañado a lo largo del camino.

A la Dra. Leonor Pérez y al Dr. Gustavo Pedraza por permitirme ser parte de su laboratorio y por darme la oportunidad de trabajar en un proyecto de investigación tan ambicioso. A la Dra. Lourdes Massieu y al Dr. Federico Sánchez por el interés que mostraron en el proyecto, y por sus comentarios y sugerencias que fueron valiosos para su desarrollo.

A Oswaldo, César, Lourdes, Itzia, Karla y Laura, que ayudaron directamente en la elaboración de este proyecto y hasta en las partes no divertidas. Y en general a todos los miembros del laboratorio NIB (Leonor, Gustavo, Miriam, Kencho, Eunice, Tomás, César, Oswaldo, Rafa, Nohemí, Laura, Lourdes, Itzia, Karla, Erick, Vicky, Clarita, Manuel y Carmelita) por sus consejos, bromas y molestias que hacen que el trabajo diario se vuelva más divertido.

A mi familia por el apoyo y cariño incondicional que siempre me ha dado. En especial a mis padres por todas las oportunidades que me han dado y por nunca dudar mi decisión de estudiar algo fuera de lo normal y lejos de casa. Gracias a ellos estoy donde estoy, haciendo lo que me gusta. Y a mi hermano por aguantarme tantos años, por su cariño y por ser tan burro como yo.

A Dani, Majo, Bere, Marifer, Cris, Arturo, Fer, Blanqui, Omash, Gaby, Moni y Carlitos por brindarme su amistad y seguirme escuchando aunque acabáramos dedicándonos a cosas muy diferentes. A los amigos que hice durante la licenciatura (a toda la 4ta generación de genómicas) y la maestría que han compartido la felicidad, los traumas y las angustias que genera el dedicarse a la ciencia.

Y más que nada a Leonor por aceptarme cuando era una pequeña genómica que no tenía idea de cómo funcionaba un laboratorio. Por todo lo que me ha enseñado estos años, y por su apoyo y guía que me han permitido crecer como científica y como persona.

A todos ellos, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Obesidad e Inflamación.....	9
Hipotálamo y Obesidad.....	11
Inflamación en el Hipotálamo	13
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Ratones	20
Glucosa en Sangre Basal.....	20
Prueba de Tolerancia a la Glucosa.....	21
Prueba de Resistencia a la Insulina.....	21
Calculo del Área Bajo la Curva.....	22
Histología de Tejido Adiposo	22
Extracción de Proteína	22
<i>Western Blot</i>	23
Anticuerpos.....	23
Análisis de Cuantificación por Densitometría	24
Análisis Estadístico	24
RESULTADOS	25

La Administración de una Dieta Alta en Grasa Conlleva al Desarrollo de Obesidad y a la Alteración de la Homeostasis de Glucosa	25
El Ambiente Enriquecido Disminuye la Ingesta, Mejora la Homeostasis de Glucosa y Aumenta la Sensibilidad a la Insulina	31
El Ambiente Enriquecido Disminuye la Prevalencia de Estructuras de Tipo Corona en el Tejido Adiposo de Ratones Alimentados con una Dieta Alta en Grasa.....	41
El Ambiente Enriquecido Regula la Activación de JNK en Hígado	43
El Ambiente Enriquecido Disminuye la Activación de JNK e IKK en el Hipotálamo.....	45
El Ambiente Enriquecido Induce Moléculas Importantes para el Funcionamiento Neuronal.....	48
Activación de la Vía de Señalización de Insulina	50
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
APENDICE I – FIGURAS SUPLEMENTARIAS	61
APENDICE II – <i>BUFFERS</i> Y SOLUCIONES	66
APENDICE III – PROTOCOLOS	69
REFERENCIAS	72

RESUMEN

La obesidad es un problema creciente de salud a nivel mundial ya que aumenta la probabilidad de desarrollar otras enfermedades, entre ellas la diabetes tipo 2. Se ha determinado que la obesidad genera un proceso inflamatorio crónico y de bajo grado que se caracteriza por la producción de citocinas pro-inflamatorias y por la activación de la vía de JNK y de IKK, entre otras. Este proceso se ha descrito en diferentes tejidos, incluyendo el hígado, el tejido adiposo y el hipotálamo. En el cerebro, el hipotálamo censa los niveles de leptina y de insulina para regular la ingesta y el gasto energético. En un estado de obesidad, la activación de las vías de JNK e IKK en el hipotálamo inhibe la vía de señalización de insulina y leptina, lo que exacerba la obesidad y genera resistencia a la insulina. A su vez, la inhibición de JNK1 o IKK beta en neuronas hipotalámicas lleva a una disminución en la ingesta y en la ganancia de peso, y aumenta la sensibilidad a la insulina.

En este estudio nos interesó estudiar el paradigma de ambiente enriquecido ya que se ha descrito que tiene un papel preventivo en el desarrollo de obesidad mediado por un aumento en los niveles de BDNF en el hipotálamo. Sin embargo, se desconoce si el ambiente enriquecido es capaz de restablecer las funciones del hipotálamo en ratones obesos que ya presentan alteraciones en el metabolismo de glucosa. Encontramos que el ambiente enriquecido disminuyó los niveles de glucosa basal, la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Adicionalmente, observamos que el ambiente enriquecido disminuyó la activación de las vías de JNK e IKK, y previno la disminución de los niveles de c-Fos y BDNF en el hipotálamo causada por la administración de una dieta alta en grasa. En conjunto nuestros datos indican que el ambiente enriquecido es capaz de re-activar la función homeostática del hipotálamo y revertir los efectos nocivos de la obesidad.

ABSTRACT

Obesity has become an increasing worldwide health problem as it increases the risk of developing other diseases such as type II diabetes. Recent studies have shown that obesity induces a chronic, low grade inflammatory state characterized by the production of different pro-inflammatory cytokines and by the activation of the JNK and IKK pathways, among others. This inflammatory process has been described in various tissues, including liver, adipose tissue and in the hypothalamus. In the brain the hypothalamus detects the levels of leptin and insulin to regulate food intake and energy expenditure. During obesity the activation of the JNK and IKK pathways in the hypothalamus inhibits both insulin and leptin signaling, this exacerbates the obesity and generates insulin resistance. Additionally, inhibition of JNK1 or IKK beta in hypothalamic neurons leads to a reduction in food intake and weight gain, and increases insulin sensitivity.

In this study, we were interested in an enriched environment paradigm because it has been described to have a preventive role in the development of obesity mediated by an increase in the levels of BDNF in the hypothalamus. Nonetheless, it is not known whether an enriched environment is capable of reestablishing hypothalamic function in obese mice that already present alterations in the glucose metabolism. We found that an enriched environment decreased basal glucose levels, glucose intolerance and insulin resistance in mice fed with a high fat diet. Additionally, exposure to an enriched environment decreased the activation of both JNK and IKK pathways and prevented the decrease in c-Fos and BDNF levels in the hypothalamus caused by the administration of a high fat diet. Together our results suggest that an enriched environment is capable of reactivating hypothalamic function to ameliorate the detrimental effects of obesity.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la obesidad y la diabetes tipo II (DT2) se han convertido en un problema mundial de salud (Sherwin and Jastreboff, 2012). La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar otros padecimientos entre ellos enfermedades cardiovasculares (Rydén and Mellbin, 2012) hepatobiliares (Strissel *et al.*, 2007), neurodegenerativas (Bruce-Keller *et al.*, 2009), cáncer (Park *et al.*, 2010) y diabetes tipo II (Bastard *et al.*, 2006; Hotamisligil, 2006). Datos de la encuesta nacional de salud y nutrición realizada en el 2012 por el Instituto Nacional de Salud Pública (ENSANUT 2012) indican que existen 6.4 millones de personas adultas con diabetes en México, que representan el 9.2% de la población adulta. Adicionalmente, el porcentaje de la población con sobrepeso en México es del 69.37% para los hombres y de 73.01% para las mujeres, de los cuales el 26.8% de los hombres y el 37.5% de las mujeres presentan obesidad. La obesidad es producida por la ingesta crónica de un exceso de energía y es controlada o propiciada por diferentes factores que interactúan entre ellos como el fondo genético, factores ambientales, de conducta, entre otros (Nguyen and El-Serag, 2010; Villalpando *et al.*, 2010).

OBESIDAD E INFLAMACIÓN

Recientemente se ha determinado que la obesidad lleva a un estado de inflamación, que constituye un factor importante en el desarrollo de la DT2 (Donath and Shoelson, 2011). Este proceso inflamatorio se distingue del concepto clásico de inflamación ya que es crónico, de bajo grado y tiene un origen metabólico, por lo que se le ha otorgado el término de metainflamación o inflamación activada por el metabolismo (Hotamisligil, 2006). Esta inflamación se caracteriza principalmente por la producción de diferentes citocinas pro-inflamatorias como interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), además de niveles elevados de la proteína C reactiva (CRP), que se pueden detectar a nivel local y en sangre (Canello *et al.*, 2005; Hotamisligil *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2010). Adicionalmente, este proceso se ha descrito en diferentes tejidos, incluyendo en hígado, páncreas, cerebro y en el tejido adiposo (Gregor and Hotamisligil, 2011).

En un contexto de obesidad, los adipocitos son capaces de producir diferentes citocinas y quimiocinas, entre ellas TNF α , la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α), que en conjunto median el reclutamiento y activación de diferentes células del sistema inmune, entre ellas neutrófilos,

eosinófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos (Cancello *et al.*, 2005; Kanda *et al.*, 2006; Ouchi *et al.*, 2011; Strissel *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2003). El perfil de células del sistema inmune que se encuentran en el tejido adiposo va cambiando durante el desarrollo de la obesidad, donde la población de linfocitos T reguladores (Treg), CD4+ y *natural killer* (NKT) va disminuyendo con el aumento en la adiposidad (Ji *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2012). A su vez, hay un aumento en la infiltración de linfocitos T CD8+ y se observa una activación preferencial de macrófagos hacia el fenotipo inflamatorio M1 sobre el fenotipo M2 residente (Lumeng *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2009; Strissel *et al.*, 2007; Weisberg *et al.*, 2003; Zeyda *et al.*, 2007). En conjunto, esto genera una disminución en las señales anti-inflamatorias y promueve un estado inflamatorio en el tejido (**Figura 1**). Aunque este proceso inflamatorio haya sido iniciado por los adipocitos, se ha determinado que en el tejido adiposo las células responsables de producir la mayor parte de las citocinas inflamatorias durante la obesidad son los macrófagos (Cancello *et al.*, 2005; Strissel *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2003). Adicionalmente, el crecimiento desmedido de los adipocitos durante la obesidad no es acompañado de un aumento en la función vascular lo que lleva a la muerte de algunos adipocitos por hipoxia, lo que a su vez favorece el reclutamiento de macrófagos infiltrantes para eliminar a los adipocitos en proceso de muerte formando estructuras de tipo "corona" (crown-like structure) donde el adipocito se ve rodeado de macrófagos (Cinti *et al.*, 2005; Strissel *et al.*, 2007).

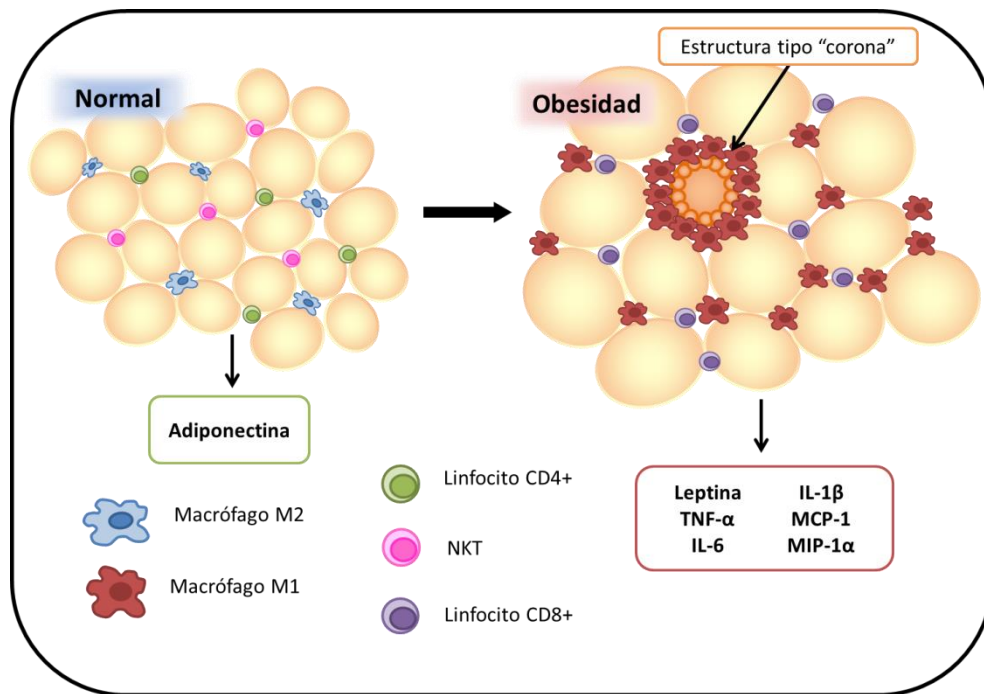


Figura 1 - Perfil de quimiocinas, citocinas y células del sistema inmune en el tejido adiposo durante el desarrollo de obesidad. Basada en Ji *et al.*, 2012; Lumeng *et al.*, 2007; Ouchi *et al.*, 2011; Strissel *et al.*, 2007; Zeyda *et al.*, 2007.

Dentro de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de un proceso inflamatorio durante la obesidad se ha determinado que un exceso de nutrientes (lípidos y glucosa) puede llevar a la activación del proceso conocido como estrés del retículo endoplásmico (Hummasti and Hotamisligil, 2010), así como de diferentes vías de señalización inflamatorias, entre ellas la vía de los receptores tipo *Toll* (TRLs) (Könner and Brünig, 2011; Milanski *et al.*, 2009), de la cinasa NH₂-terminal de c-Jun (JNK) (Bashan *et al.*, 2007; Sabio and Davis, 2010), la vía del factor nuclear Kappa B (IKK β /NF- κ B) (Arkan *et al.*, 2005; Cai, 2009), de la proteína cinasa C (PKC) (Schmitz-Peiffer and Biden, 2008) y del inflamasoma de NALP3 (Vandanmagsar *et al.*, 2011). Diferentes estudios han demostrado que la activación de estas vías inflamatorias y el aumento en citocinas pro-inflamatorias juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina y de DT2 ya que interfieren con la señalización de insulina (Bashan *et al.*, 2007; Hotamisligil, 2006; Odegaard and Chawla, 2013). De acuerdo con esto, se ha demostrado experimentalmente que la administración exógena de TNF α induce resistencia a la insulina (Yuan *et al.*, 2001), mientras que la delección de JNK1 previene el desarrollo de una obesidad inducida por una dieta alta en grasas y el desarrollo de resistencia a la insulina (Sabio and Davis, 2010; Tuncman *et al.*, 2006). De forma similar, la deficiencia de IKK β o PKC θ previene el desarrollo de la resistencia a insulina inducida por una dieta alta en grasa (Kim *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2001).

HIPOTÁLAMO Y OBESIDAD

En el cerebro, el hipotálamo es la estructura encargada de la regulación de la homeostasis ya que tiene la capacidad de interpretar e integrar diferentes señales del organismo y del entorno para dar una respuesta mediante la regulación del sistema neuroendócrino. El hipotálamo regula diferentes funciones como el ciclo del sueño, la temperatura corporal, el flujo sanguíneo, la respuesta a estrés, la respuesta inmune, el control de la ingesta y el gasto energético; estas dos últimas funciones relacionan al hipotálamo con el desarrollo de la obesidad (Bao *et al.*, 2008; Baskin *et al.*, 1999; Glaser and Kiecolt-glaser, 2005; Marino *et al.*, 2011; Marques-Deak *et al.*, 2005; Straub *et al.*, 2010). El hipotálamo censa los niveles de leptina y de insulina del organismo lo que le proporciona información acerca del estado nutricional del organismo (Morton *et al.*, 2006). La leptina es una adipocina que es secretada por los adipocitos como señal de saciedad mientras que la insulina es una hormona secretada por el páncreas en respuesta a los niveles de glucosa en sangre.

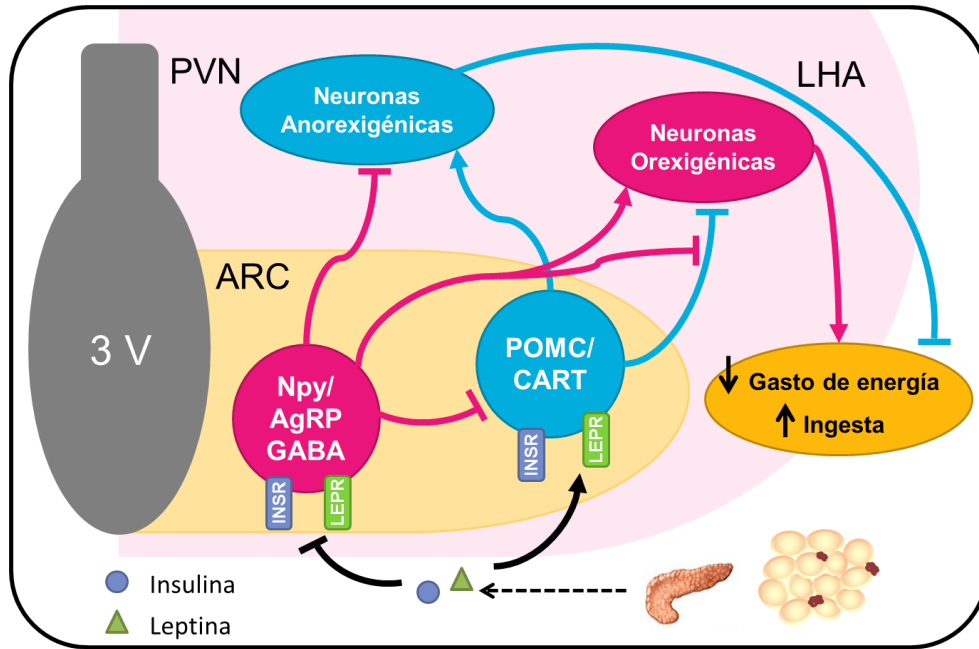


Figura 2 - Regulación del balance energético en el hipotálamo en respuesta a insulina y leptina. Basada en Morton and Schwartz, 2010; Remmers and Deleamarre-van de Waal, 2011.

En el hipotálamo, el núcleo arcuato (ARC) integra la señales energéticas del organismo ya que cuenta con dos poblaciones diferentes de neuronas que expresan a los receptores de insulina (INSR) y de leptina (LEPR); una población orexigénica (estimuladora de la ingesta) que expresa al neuropéptido Y (NPY) y al péptido relacionado a agouti (AgRP); y una población anorexigénica (supresora de la ingesta) que expresa el péptido proopiomelanocortina (POMC) y al transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Balthasar *et al.*, 2004; Berglund *et al.*, 2012; Cowley *et al.*, 2001; Elias *et al.*, 1999; Gropp *et al.*, 2005; Joly-Amado *et al.*, 2012; Kohno and Yada, 2012; Satoh *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2000). Las neuronas orexigénicas del ARC inervan el área lateral hipotalámica (LHA) donde existen otras poblaciones de neuronas orexigénicas que expresan a la hormona concentradora de melanina (MCH) o a las hormonas orexinas (ORX), las cuales estimulan la ingesta y disminuyen el gasto energético (Leinninger, 2011; Saito, 2008). Adicionalmente, las neuronas anorexigénicas del núcleo arcuato inervan el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo donde regulan a las poblaciones neuronales que expresan a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) o a la hormona liberadora de adrenocorticotropina (CRH) las cuales tienen un papel anorexigénico y catabólico (Lechan and Fekete, 2006; Remmers and Deleamarre-van de Waal, 2011). Altos niveles de leptina e insulina inhiben las vías orexigénicas y al mismo tiempo estimulan las vías anorexigénicas en el hipotálamo, lo que lleva a una disminución de

la ingesta y a un aumento del gasto de energía (Marino *et al.*, 2011; Morton and Schwartz, 2011; Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000) **(Figura 2)**.

A nivel molecular, la insulina al unirse a su receptor induce su actividad de tirosina cinasa, mediando la autofosforilación del receptor y la fosforilación de sus blancos, entre ellos el sustrato del receptor de insulina (IRS) (Shaw, 2011; Taniguchi *et al.*, 2006). Al ser activado por fosforilación en residuos de tirosina, IRS es capaz de activar la vía de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), la cual lleva a la activación de AKT que media diferentes procesos en la célula como la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática, la inhibición de la cinasa de la sintasa de glicógeno (GSK3) y la inhibición del factor de transcripción FOXO1 (Forkhead box O1) (Belgardt *et al.*, 2009; Folli *et al.*, 1996; Saltiel and Kahn, 2001). FOXO1 activa la transcripción de AgRP y NPY mientras que inhibe la transcripción de POMC (Kim *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 2006), por lo que al ser inhibido por la activación de AKT resulta en la inducción de los genes anorexigénicos en respuesta a insulina (Morton *et al.*, 2006; Ropelle *et al.*, 2009). A su vez, la leptina señala a través de un receptor asociado a tirosina cinasas. La unión de leptina a su receptor resulta en la interacción con la tirosina cinasa de Janus 2 (JAK2) lo que induce su activación, la cual a su vez fosforila al receptor de leptina para generar sitios de andamiaje (Ahima and Osei, 2004; Morton and Schwartz, 2011; Sweeney, 2002). Estos sitios de andamiaje son reconocidos por la proteínas STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) e IRS, que al unirse al receptor de leptina su proximidad permite que sean fosforiladas y activadas por JAK2 (Xu *et al.*, 2007). La activación de IRS continua por la vía de señalización de PI3K descrita para el receptor de insulina, mientras que STAT3 al ser fosforilado es capaz de dimerizar y trasladarse al núcleo para actuar como factor de transcripción (Carvalho *et al.*, 2001). STAT3 activa la transcripción de POMC mientras que inhibe la transcripción de AgRP y NPY (Kitamura *et al.*, 2006; Morrison *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007). De igual manera, STAT3 activa la transcripción de SOCS3 (supresor of cytokine signaling 3) que funciona como regulador negativo de la vía ya que inhibe la activación de JAK2 (Bjørbaek *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1999; Münzberg *et al.*, 2004) **(Figura 3)**.

INFLAMACIÓN EN EL HIPOTÁLAMO

Estudios en murinos han determinado que la obesidad puede generar un proceso similar a la metainflamación en el hipotálamo, caracterizado por la activación de diferentes vías de señalización incluyendo la vía de JNK (De Souza *et al.*, 2005), de IKK/NF- κ B (Meng and

Cai, 2011; Posey *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008), la respuesta de estrés del retículo endoplásmico (Ozcan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008); así como a un aumento en los niveles de mediadores inflamatorios como IL-1 β , TNF α e IL-6 (Milanski *et al.*, 2009; De Souza *et al.*, 2005), que correlacionan temporalmente con el desarrollo de la resistencia a la leptina e insulina (Cai, 2009; Purkayastha *et al.*, 2011). El desarrollo de resistencia a la leptina es uno de los factores que predispone a la obesidad inducida por dieta en modelos murinos donde el hipotálamo no es capaz de responder a los niveles crecientes de leptina, por lo que se ha asociado a la obesidad con un estado de hiperleptinemia (Ahren *et al.*, 2012; Balthasar *et al.*, 2004; Caro *et al.*, 1996; Münzberg *et al.*, 2004; Thaler and Schwartz, 2010). De igual manera, la resistencia a la insulina es uno de los factores determinantes en el desarrollo de diabetes tipo II, lo que se ha asociado a un estado de hiperinsulinemia para intentar evocar una respuesta (Mehran *et al.*, 2012).

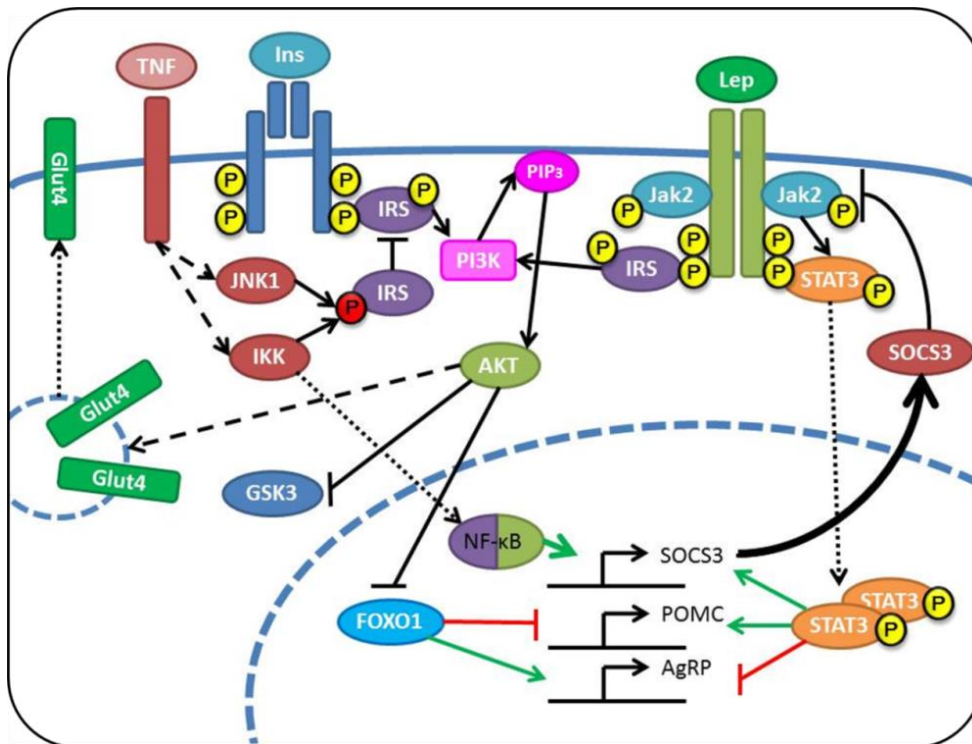


Figura 3 - Vías de señalización involucradas en el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. Basada en Gregor and Hotamisligil, 2011; Morton *et al.*, 2006; Morton and Schwartz, 2010; Sweeney *et al.*, 2002; Taniguchi *et al.*, 2006.

La activación de las vías de señalización de JNK e IKK/NF- κ B puede inhibir la señalización de insulina y de leptina de varias formas. Las cinasas JNK e IKK pueden fosforilar directamente a IRS en residuos de serina que inhiben la fosforilación en residuos de tirosina por el receptor de insulina o por JAK2 (Aguirre *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002). Adicionalmente,

la activación y translocación al núcleo de NF- κ B lleva a la transcripción de SOCS3, por lo que en un estado de inflamación la sobre activación de NF- κ B lleva a un aumento en los niveles de SOCS3, lo que inhibe la activación de JAK2 y la fosforilación del receptor de leptina (Bjørbaek *et al.*, 1998; De Souza *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Esto lleva de igual manera a la inhibición de la señalización de leptina y a una falla en la regulación de la ingesta y del gasto energético (Münzberg *et al.*, 2004) **(Figura 3)**.

La relevancia de la activación de las vías de JNK e IKK/NF- κ B en el hipotálamo se ha determinado por diferentes estudios en murinos mediante la inhibición de estas vías. La delección o inhibición farmacológica de IKK β en el hipotálamo lleva a una disminución en la ingesta y en la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Posey *et al.*, 2009), mientras que la activación constitutiva de IKK β o la sobreexpresión de SOCS3 en neuronas llevan a la inhibición de la vía de insulina y leptina, y a un aumento en la ingesta y en la ganancia de peso (Zhang *et al.*, 2008). Adicionalmente, la delección o inhibición farmacológica de JNK1 en el sistema nervioso aumenta la sensibilidad a la insulina y previene del desarrollo de obesidad inducida por una dieta alta en grasas mediante una disminución en la ingesta y un aumento de la actividad física y del gasto de energía, debido a un aumento en la señalización del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (Belgardt *et al.*, 2010; Benzler *et al.*, 2013; Sabio *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2005).

Estos datos en conjunto sugieren que la obesidad y un estado de inflamación crónica en el organismo conduce a una disfunción en las vías que regulan la ingesta y el gasto energético en el hipotálamo lo que estaría contribuyendo a una exacerbación de los síntomas asociados con la obesidad que eventualmente resulta en el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tipo II. Esta disfunción estaría acompañada de cambios en la expresión génica por lo que resulta atractivo identificar las señales que median la función del hipotálamo como regulador de la respuesta inmune en un modelo de inflamación inducida por obesidad.

ANTECEDENTES

Diversos estudios han determinado que un paradigma de ambiente enriquecido lleva a la activación de diferentes regiones del cerebro incluyendo la corteza, el hipocampo, el cerebelo y el hipotálamo (Ali *et al.*, 2009; Ickes *et al.*, 2000; Rampon *et al.*, 2000). El ambiente enriquecido se refiere a condiciones habitacionales que promueven una estimulación sensorial, visual, cognitiva, social y motora en comparación a las condiciones habitacionales normales, donde es importante mantener un componente de complejidad y novedad (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Se ha observado que un ambiente enriquecido tiene diversos efectos fisiológicos en el sistema nervioso central incluyendo un aumento en el número y longitud de ramificaciones dendríticas, en el número de espinas dendríticas, en el tamaño de las sinapsis de ciertas poblaciones neuronales, en la neurogénesis en el hipocampo y en la integración de estas neuronas nuevas en circuitos funcionales, en el aprendizaje, la memoria, la plasticidad neural y en la potenciación a largo plazo (Praag *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2010; Ziv *et al.*, 2006). De igual manera, se ha determinado que un ambiente enriquecido puede modificar los niveles de expresión en el sistema nervioso entre los cuales se puede destacar un aumento en los niveles de diferentes neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), y en la expresión de proteínas sinápticas (Ickes *et al.*, 2000; Kuzumaki *et al.*, 2011; Rampon *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001).

Los efectos del ambiente enriquecido no están limitados al sistema nervioso, ya que también se ha observado una alteración en los niveles de ciertas hormonas en sangre (ej. aumenta los niveles de corticoesterona) (Bakos *et al.*, 2009; Marashi *et al.*, 2003). El ambiente enriquecido también tiene diversos efectos en la regulación del sistema inmune, donde se ha observado que puede alterar los niveles de diferentes citocinas en condiciones basales y en respuesta a un insulto (Laviola *et al.*, 2004; Marashi *et al.*, 2003; Mlynarik *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2012). De igual forma, el ambiente enriquecido estimula la actividad de células *natural killer* (NK) y mantiene la función de macrófagos y linfocitos durante el envejecimiento (Arranz *et al.*, 2010; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha determinado que el ambiente enriquecido lleva a la activación de la microglia mediada por el reclutamiento de linfocitos Th2 que expresan a la citocina IL-4, que a su vez eleva los niveles de IGF-1 y BDNF, lo que promueve y mantiene la neurogénesis en el hipocampo (Ziv *et al.*, 2006).

El paradigma de ambiente enriquecido también ha sido ampliamente estudiado por tener efectos benéficos en diferentes modelos murinos de patologías incluyendo enfermedades del desarrollo neural (Reynolds *et al.*, 2010), enfermedades neurodegenerativas (Laviola *et al.*, 2008; Nithianantharajah and Hannan, 2006), cáncer (Cao *et al.*, 2010) y en la prevención de la obesidad (Cao *et al.*, 2011). Recientemente se determinó que el ambiente enriquecido es capaz de disminuir y hasta prevenir el crecimiento de tumores en diferentes modelos de cáncer en ratón (Cao *et al.*, 2010). En este estudio se determinó que el efecto está mediado principalmente por la inducción de BDNF en el hipotálamo que a su vez lleva a una alteración en los niveles de adipocinas en sangre y a un aumento en la actividad de células NK para impedir el crecimiento tumoral (Cao *et al.*, 2010). De igual manera, se ha observado que ratones sometidos a un ambiente enriquecido son más delgados y presentan una resistencia al desarrollo de una obesidad inducida por una dieta alta en grasas (Cao *et al.*, 2011). En este estudio se observó que el ambiente enriquecido, mediante la activación de BDNF en el hipotálamo, lleva a la diferenciación del tejido adiposo blanco (o de almacenamiento) hacia un tejido adiposo pardo, el cual gasta más energía mediante la generación de calor, lo que contribuye a la resistencia en el desarrollo de obesidad. También se observó un aumento en los niveles de TRH en el hipotálamo en respuesta a un ambiente enriquecido y a la inducción de BDNF, lo que podría sugerir una mayor actividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides que ha sido relacionado con un aumento del metabolismo energético. Dado que un paradigma de ambiente enriquecido puede regular al sistema inmune y favorecer las funciones homeostáticas del hipotálamo, decidimos determinar si un ambiente enriquecido es capaz de disminuir la inflamación y aumentar la sensibilidad a la insulina en un modelo murino de obesidad y diabetes tipo II.

JUSTIFICACIÓN

Por muchos años se han utilizado diferentes modelos murinos de obesidad y diabetes tipo II para intentar determinar los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de estas enfermedades. Dentro de estos, el modelo de obesidad y diabetes tipo II inducido por la administración de una dieta alta en grasa ha sido ampliamente estudiado por tener similitudes con el desarrollo de estas enfermedades en humanos.

En este modelo se ha determinado que la administración de una dieta alta en grasa genera un proceso inflamatorio en diferentes tejidos que se caracteriza por la secreción de citocinas pro-inflamatorias y por la activación de diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de JNK e IKK. La importancia de estas vías se ha determinado utilizando ratones *knockout* para JNK1 o IKK β que presentan una disminución en la ingesta y en la ganancia de peso, y una mayor sensibilidad a la insulina. De forma interesante, la inhibición de JNK1 o IKK β específicamente en neuronas hipotálamicas genera efectos similares, lo que sugiere la importancia del hipotálamo en la regulación del metabolismo energético.

Interesantemente, se ha observado que un paradigma de ambiente enriquecido tiene efectos benéficos sobre el sistema nervioso y puede regular la activación del sistema inmune. Así mismo, se ha demostrado que el ambiente enriquecido tiene un papel preventivo en el desarrollo de obesidad y que este efecto es mediado por la activación del hipotálamo. Sin embargo, se desconoce si el ambiente enriquecido puede revertir los efectos nocivos de la obesidad sobre la homeostasis del organismo. Por ello, decidimos determinar si el ambiente enriquecido es capaz de activar la función del hipotálamo para restablecer la homeostasis de glucosa del organismo en ratones que ya presentan un estado de obesidad y resistencia a la insulina. Esto resultaría importante ya que si nuestra hipótesis fuera correcta, el paradigma de ambiente enriquecido podría ser utilizado como una terapia alternativa para intentar solucionar un problema creciente de salud a nivel mundial y especialmente en México.

HIPÓTESIS

El ambiente enriquecido favorece la función homeostática del hipotálamo en un modelo murino de obesidad y diabetes tipo II, mediante la disminución en la inflamación y mejorando la sensibilidad a insulina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de un ambiente enriquecido en la sensibilidad a la insulina y en la activación de vías de señalización de JNK e IKK.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Generar y validar el modelo murino de obesidad inducida por dieta y el desarrollo de resistencia a la insulina
- ❖ Determinar si el ambiente enriquecido aumenta la sensibilidad a la insulina
- ❖ Determinar si el ambiente enriquecido disminuye la activación de las vías de JNK e IKK asociada a un estado de obesidad

MATERIALES Y METODOS

RATONES.

Se utilizaron 60 ratones de la cepa C57BL/6N (Harlan Laboratories, SA. de CV.) de 3 a 4 semanas de edad para formar el grupo experimental 1. Los animales se mantuvieron en el bioterio siguiendo las reglas establecidas por el comité de bioética, manteniendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron separados en jaulas convencionales de 5 ratones y fueron divididos en dos grupos de 30 ratones para administrarles una dieta normal (DN) (Harlan, Teklad 2018SX) o una dieta alta en grasa (DAG) (Research Diets, D12492). Después de 16 semanas cada grupo fue dividido en dos condiciones habitacionales diferentes, 15 ratones de cada grupo se mantuvieron en un ambiente normal y 15 ratones se pasaron a un ambiente enriquecido. El ambiente normal (AN) consiste en cajas de 21 cm ancho X 29 cm largo X 16 cm altura en las cuales se colocaron 5 ratones. El ambiente enriquecido (AE) consiste en cajas de 32 cm ancho X 88 cm largo X 47.6 cm altura en las cuales se colocaron 15 ratones, en estas jaulas se colocaron juguetes de varios tipos; incluyendo túneles, rollos de cartón, casas de plástico, pelotas, frascos de vidrio, estructuras de madera, entre otros. Los juguetes y su ubicación fueron modificados cada semana para mantener el componente de novedad. Los ratones y la comida sobrante fueron pesados semanalmente para mantener un control de la ganancia de peso y del consumo de alimento por jaula. Los ratones se sacrificaron a las 28 semanas experimentales por inhalación de CO₂. Para el grupo experimental 2 se utilizaron 60 ratones C57BL/6N de 6-7 semanas de edad los cuales fueron divididos como fue descrito para el grupo experimental 1 para administrar una DN o una DAG. Después de 13 semanas los grupos fueron divididos en las dos condiciones habitacionales diferentes y fueron sacrificados a las 28 semanas como fue descrito para el grupo 1.

GLUCOSA EN SANGRE BASAL.

Los valores de glucosa basal se obtuvieron a las 10 semanas (26 semanas totales para el grupo experimental 1) o a las 12 semanas (25 semanas totales para el grupo experimental 2) de que los ratones fueron divididos en un AN o AE (n= 8-10 por grupo). Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas, removiendo la comida a las 8 am y realizando la medición de los valores de glucosa en sangre a las 2 pm, obteniendo una gota de sangre a partir de la cola del ratón y utilizando un glucómetro y tiras reactivas para glucosa (ACCU-CHECK Active de Roche).

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

La prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) se realizó 15 semanas (grupo experimental 1) u 11 semanas (grupo experimental 2) después de que los ratones fueron sometidos a una DN y a una DAG; así como, a las 10 semanas (26 semanas totales para el grupo experimental 1) o a las 9 semanas (22 semanas totales para el grupo experimental 2) de ser divididos en un AN y AE (n=5 por grupo). La prueba se realizó con 6 horas de ayuno, removiendo la comida a las 8 am y realizando la prueba a las 2 pm. Los ratones se colocaron debajo de una lámpara para favorecer la vasodilatación y se determinaron los valores de glucosa en sangre basal después del ayuno (tiempo 0) obteniendo una gota de sangre a partir de la cola del ratón y utilizando un glucómetro y tiras reactivas para glucosa (ACCU-CHECK Active de Roche). Subsecuentemente, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 1.8 mg de glucosa por gramo de peso con una solución de glucosa a una concentración de 0.18 g/ml en PBS 1X estéril. Se registraron los valores de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa.

PRUEBA DE RESISTENCIA A INSULINA.

La prueba de resistencia a la insulina (PRI) se realizó 15 semanas (grupo experimental 1) u 11 semanas (grupo experimental 2) después de que los ratones fueron sometidos a una DN y a una DAG; así como, a las 10 semanas (26 semanas totales para el grupo experimental 1) o a las 12 semanas (25 semanas totales para el grupo experimental 2) después de ser divididos en un AN y AE (n=5 por grupo). La prueba se realizó con 6 horas de ayuno removiendo la comida a las 8 am y realizando la prueba a las 2 pm. Los ratones se colocaron debajo de una lámpara para favorecer la vasodilatación y se determinaron los valores de glucosa en sangre basal después del ayuno (tiempo 0) obteniendo una gota de sangre a partir de la cola del ratón y utilizando un glucómetro y tiras reactivas para glucosa (ACCU-CHECK Active de Roche). Subsecuentemente, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 1mU de insulina por gramo de peso con una solución de insulina (Humulin R, Eli Lilly) preparada a una concentración de 0.1U/ml en PBS 1X estéril, o una inyección de PBS 1X estéril como control. Se registraron los valores de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa.

CALCULO DEL ÁREA BAJO LA CURVA.

El área total bajo la curva de glucosa de las pruebas de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina fue calculada utilizando la fórmula de Tai (Tai, 1994) o regla trapezoidal.

$$Area = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n X_i - X_{(i-1)} (Y_{(i-1)} + Y_i)$$

Donde los valores de X corresponden al tiempo de medición y los valores de Y corresponden a la concentración de glucosa en sangre a cada tiempo.

HISTOLOGIA DE TEJIDO ADIPOSEO.

Posterior al sacrificio de ratones, el tejido adiposo visceral se colectó, parte de este se fijó en paraformaldehído al 4% y se guardó a 4°C hasta su uso. Para su análisis histológico, el tejido se embebió en parafina y se realizaron cortes histológicos para su posterior tinción con hematoxilina-eosina. Todo el procesamiento del tejido se realizó en la unidad de histología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las microfotografías de los cortes de tejido fueron tomadas en un microscopio óptico invertido NIKON ECLIPSE TS100 utilizando el objetivo 20X. El área de los adipocitos se calculó utilizando el programa ImageJ utilizando 3 campos independientes por ratón.

EXTRACCIÓN DE PROTEINA.

Se extrajo proteína total de hígado y de hipotálamo de los ratones correspondientes a cada grupo experimental. Los extractos proteicos se prepararon usando el *buffer* de lisis TLB (Triton Lysis Buffer) (Ver Apéndice II). El TLB se complementó con PMSF (1mM), leupeptina (5µg/µl), pepstatina (5µg/µl), aprotinina (5µg/µl), antipaína (5µg/µl), Na₃VO₄ (1mM) y DTT (0.5mM). A cada fragmento de tejido se agregó 500µl (hígado) o 300µl (hipotálamo) de *buffer* de lisis para ser sonificado. Este lisado se centrifugó a 14,500 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. El contenido proteico se determinó por el método de Bradford utilizando una curva estándar de BSA.

WESTERN BLOT.

30µg de proteína fueron analizados en geles de acrilamida (SDS-PAGE) al 10% o 12% usando 30mA por gel. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane – GE Healthcare) usando 100V por 90 minutos. La membrana fue bloqueada 1 hora a temperatura ambiente en leche al 5% en TBS 1X 0.1% de Tween (TBS-T 0.1%). El anticuerpo primario se incubó toda la noche (p-JNK, p-IKK, BDNF, c-Fos, p-AKT y AKT) o 4 horas (JNK, ERK) en agitación a 4°C. El anticuerpo secundario se incubó de 1 a 2 horas a temperatura ambiente en agitación. La membrana se reveló utilizando el sustrato Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer Inc.) y películas radiográficas (Kodak Films – Medical X-ray General Purpose Blue).

ANTICUERPOS.

Los anticuerpos para p-JNK, JNK, p-IKK, p-AKT, AKT (Cell Signaling) y ERK, c-Fos y BDNF (Santa Cruz Biotechnology) se diluyeron en leche o BSA al 5% en TBS-T 0.1% según indicado y se utilizaron a las siguientes diluciones:

Anticuerpo	# catálogo	diluyente	Dil. primario	αB secundario	Dil. secundario
ERK	SC-154	Leche	1:8000	Conejo	1:10000
p-JNK	9255	Leche	1:2000	Ratón	1:5000
JNK	9252	BSA	1:2000	Conejo	1:5000
p-IKK	2697	BSA	1:1000	Conejo	1:5000
c-Fos	SC-52	Leche	1:1000	Conejo	1:5000
BDNF	SC-546	Leche	1:1000	Conejo	1:5000
p-AKT	9271	BSA	1:1000	Conejo	1:5000
AKT	9272	BSA	1:2000	Conejo	1:5000

Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP) anti-conejo (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Invitrogen G-21234) y anti-ratón (Rabbit anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology SC-2005).

ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN POR DENSITOMETRIA.

Se utilizó el software Image Lab™ (BIO-RAD) para obtener la densidad óptica de las bandas obtenidas de los ensayos de *Western Blot*. Los niveles de proteína fosforilada fueron corregidos contra la proteína total correspondiente. Todos los valores fueron corregidos contra el control de carga ERK.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores obtenidos de los diferentes experimentos fueron reportados como medias \pm error estándar. Se realizaron análisis de doble varianza (ANOVA) y pruebas t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos de DN y DAG. Para comparar los datos entre los 4 grupos experimentales se realizaron análisis de ANOVA de una vía y pruebas t de Student. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas pruebas con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Sesenta ratones de la cepa C57BL/6N de 3-4 semanas de edad fueron marcados, pesados y separados en jaulas con 5 ratones (semana 0). Los ratones se dividieron en dos grupos donde a la mitad (30 ratones) se les administró una dieta normal (DN) y a la otra mitad se les administró una dieta alta en grasa (DAG) (**Tabla 1**). Se mantuvo un control semanal de la ganancia de peso y del consumo de alimento por 16 semanas (Grupo experimental 1: gp1).

	Composición Calórica			Kcal/gr	Dieta
	Proteína	Carbohidratos	Grasa		
Dieta normal (DN)	24 %	58 %	18 %	3.1	2018SX (Teklad)
Dieta alta en grasa (DAG)	20 %	20 %	60 %	5.24	D12491 (Research Diets)

Tabla 1. Información nutrimental y contenido energético de la dieta normal y dieta alta en grasa.

LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DIETA ALTA EN GRASA CONLLEVA AL DESARROLLO DE OBESIDAD Y A LA ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA

En cuanto a la ganancia de peso, se observó que el peso entre los dos grupos de dietas fue similar durante las primeras semanas, probablemente debido a que los ratones empezaron la dieta a una edad temprana y seguían creciendo. Aun así se puede observar que al paso de las semanas, especialmente a partir de la semana 9, los ratones alimentados con una DAG presentaron un peso significativamente mayor comparado al grupo de la misma edad sometido a una DN (**Figura 4A y 4B**).

Para corroborar estas observaciones, se formó un segundo grupo experimental (Grupo experimental 2: gp2) utilizando sesenta ratones C57BL/6N que fueron marcados y separados como fue descrito para el grupo experimental 1, solo que la administración de las dietas inició entre las 6-7 semanas de edad. Para este grupo, observamos que la diferencia de peso entre los grupos de dietas fue significativamente diferente desde la tercera semana y el aumento de peso fue más rápido que lo observado para el grupo experimental 1. Para las 13 semanas los ratones del grupo 2 (gp2) habían alcanzado un peso similar a las 16 semanas del grupo 1 (gp1) (40.72 ± 1.029 gp1 vs. 40.6 ± 0.8 gp2) (**Figura 4C y 4D**).

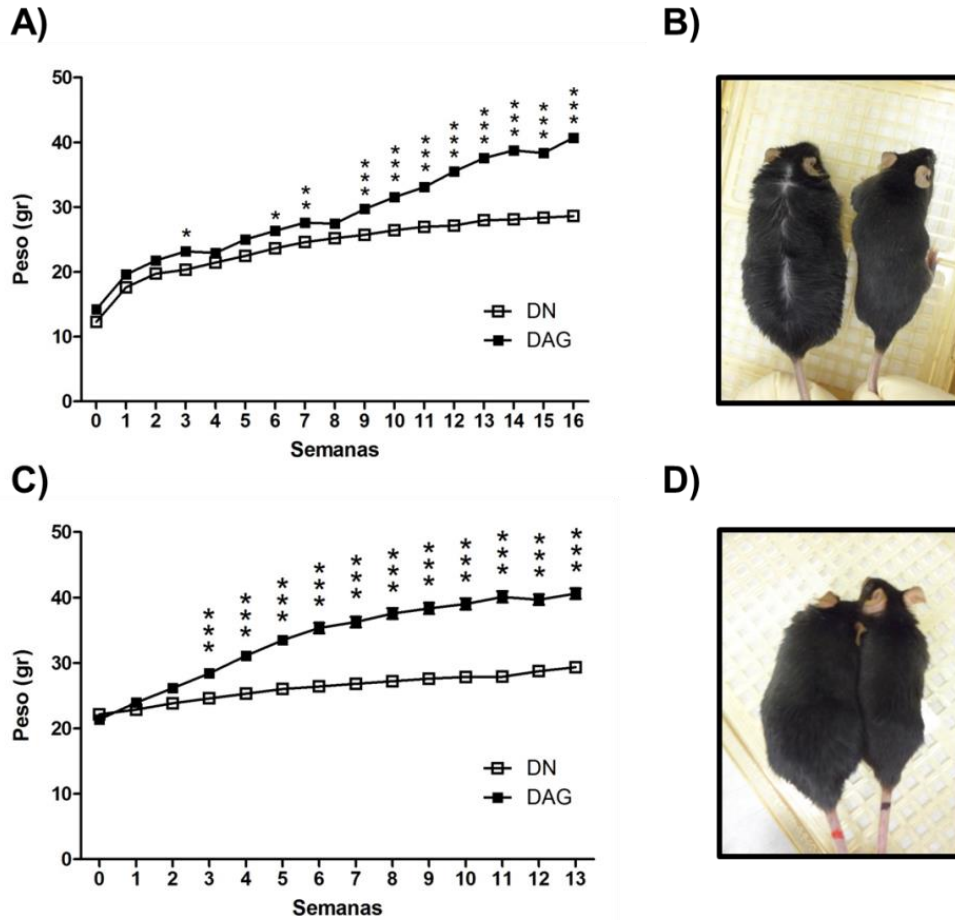


Figura 4 - Ganancia de peso semanal de ratones alimentados con una dieta normal o a una dieta alta en grasa

A) Ratones de 3-4 semanas de edad fueron alimentados con una dieta normal (DN) (□) o con una dieta alta en grasa (DAG) (■), el peso de los ratones fue monitoreado por 16 semanas (Grupo experimental 1). **B)** Foto representativa de un ratón alimentando con una DAG (izquierda) y uno alimentado con una DN (derecha) por 16 semanas (Grupo experimental 1). **C)** Ratones de 6-7 semanas de edad fueron alimentados con una DN o a una DAG, el peso de los ratones fue monitoreado por 13 semanas (Grupo experimental 2). **D)** Foto representativa de un ratón alimentando con una DAG (izquierda) y uno alimentado con una DN (derecha) por 13 semanas (Grupo experimental 2). En las gráficas se muestra la media de los pesos \pm error estándar (n=30). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 vs. DN (ANOVA de 2 vías)

Se calculó el consumo promedio de alimento a la semana y se observó que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa consumieron una menor cantidad de alimento en gramos (19.49 gr \pm 0.4742 DAG vs. 22.90 gr \pm 0.3912 DN, p<0.001 gp1; 17.5 gr \pm 0.14 DAG vs. 23.17 gr \pm 0.19 DN, p<0.001 gp2) (**Figura 5A y 5C**) pero consumieron una cantidad mayor de kilocalorías a la semana (102.1 kcal \pm 2.485 DAG vs. 70.98 kcal \pm 1.213 DN, p<0.001 gp1; 91.74 kcal \pm 0.73 DAG vs. 71.85 kcal \pm 0.61 DN, p<0.001 gp2) al comparar con los ratones alimentados con una dieta normal (**Figura 5B y 5D**) para los dos grupos experimentales, lo que es consistente con su aumento de peso (**Tabla 2**).

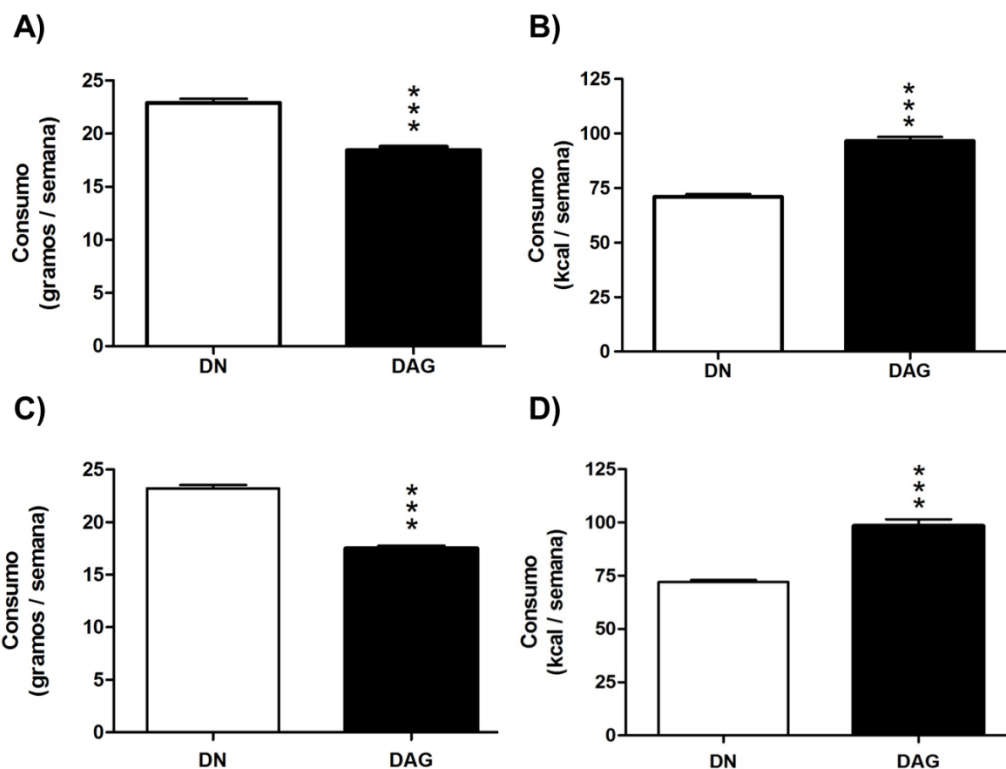


Figura 5 - Consumo semanal de alimento por ratón.

Consumo semanal promedio de ratones alimentados con una dieta normal (DN) o a una dieta alta en grasa (DAG) por 16 semanas (grupo experimental 1) **(A y B)** y 13 semanas (grupo experimental 2) **(C y D)** en gramos de alimento **(A y C)** y en kilocalorías **(B y D)**. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=30). *** P<0.001 vs. DN (Prueba t de Student)

Para determinar el estado del metabolismo de glucosa e insulina de los ratones alimentados con una DN y DAG, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG) y de resistencia a la insulina (PRI) a los dos grupos experimentales a las 15 semanas (gp1) y 11 semanas (gp2) de ser alimentados con las dietas. Para realizar estas pruebas los ratones fueron sometidos a un ayuno, posteriormente se midieron los niveles de glucosa en sangre basal y a diferentes tiempos después de una inyección intraperitoneal de glucosa (1.8 mg/gr) **(Figura 6)** o insulina (1mU/gr) **(Figura 7)**. En base a estudios previos donde se ha observado que la duración del ayuno puede causar variaciones en la regulación de glucosa y afectar la significancia observada en las curvas de glucosa entre grupos sometidos a una dieta normal contra una dieta alta en grasa (Andrikopoulos *et al*, 2008), se realizaron ensayos previos utilizando dos tiempos de ayuno (4 y 6 horas) y se determinó que un ayuno de 6 horas permite determinar las diferencias en la respuesta a una inyección de glucosa o de insulina entre las dos dietas (datos no mostrados).

Al realizar la prueba de tolerancia a la glucosa observamos que los ratones alimentados con una DN de ambos grupos experimentales respondieron correctamente a la inyección intraperitoneal de glucosa, donde se observó un aumento en los niveles de glucosa a tiempos cortos y su posterior disminución (a partir de los 30 minutos), acercándose a los niveles basales a las 2 horas (**Figura 6A y 6C**). En los ratones alimentados con una DAG, los niveles de glucosa en sangre en respuesta a la inyección de glucosa fueron mayores, y este aumento se mantuvo a lo largo de toda la curva, observándose un incremento mayor en los ratones del grupo experimental 2 (**Figura 6A y 6C**). Al determinar el área bajo la curva (ABC), como evidencia cuantitativa de las diferencias globales en el comportamiento de la curva de glucosa, se observó que la respuesta a la inyección de glucosa fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en los ratones alimentados con una DAG con respecto a la DN en los dos grupos experimentales (**Figura 6B y 6D**).

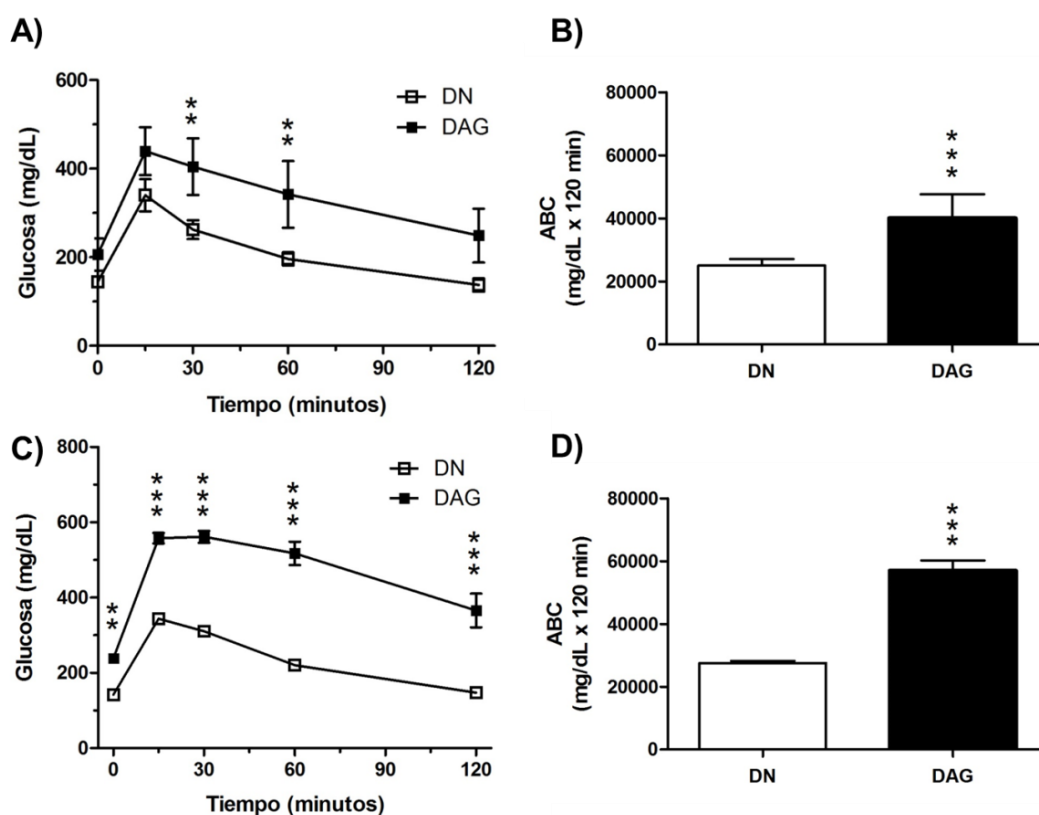


Figura 6 - Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG).

(A y C) PTG en ratones alimentados con una dieta normal (DN) (□) o con una dieta alta en grasa (DAG) (■) del grupo experimental 1 (15 semanas) (A) y del grupo experimental 2 (11 semanas) (C). La gráfica muestra la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1.8 mg/gr de glucosa. (B y D) El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 (B) y el grupo 2 (D) de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar (n=5). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. DN (ANOVA de 2 vías [A y C] y prueba t de Student [B y D])

Al realizar la prueba de resistencia a la insulina en el grupo experimental 1, observamos que los ratones alimentados con una DN y con una DAG fueron capaces de responder a un bolo de insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre (**Figura 7A**). Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre en los ratones alimentados con una DAG fueron mayores en todos los tiempos analizados (**Figura 7A**), lo que indica una alteración en la respuesta a glucosa. Además, la diferencia entre las áreas bajo la curva fue significativamente diferente ($p < 0.001$) al comparar los ratones en DN contra DAG (**Figura 7B**). Interesantemente, al realizar la prueba en los ratones del grupo experimental 2 observamos que los ratones alimentados con una DN respondieron correctamente a la inyección de insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre, mientras que en los ratones alimentados con una DAG se observó un aumento en los niveles de glucosa en sangre (**Figura 7C**).

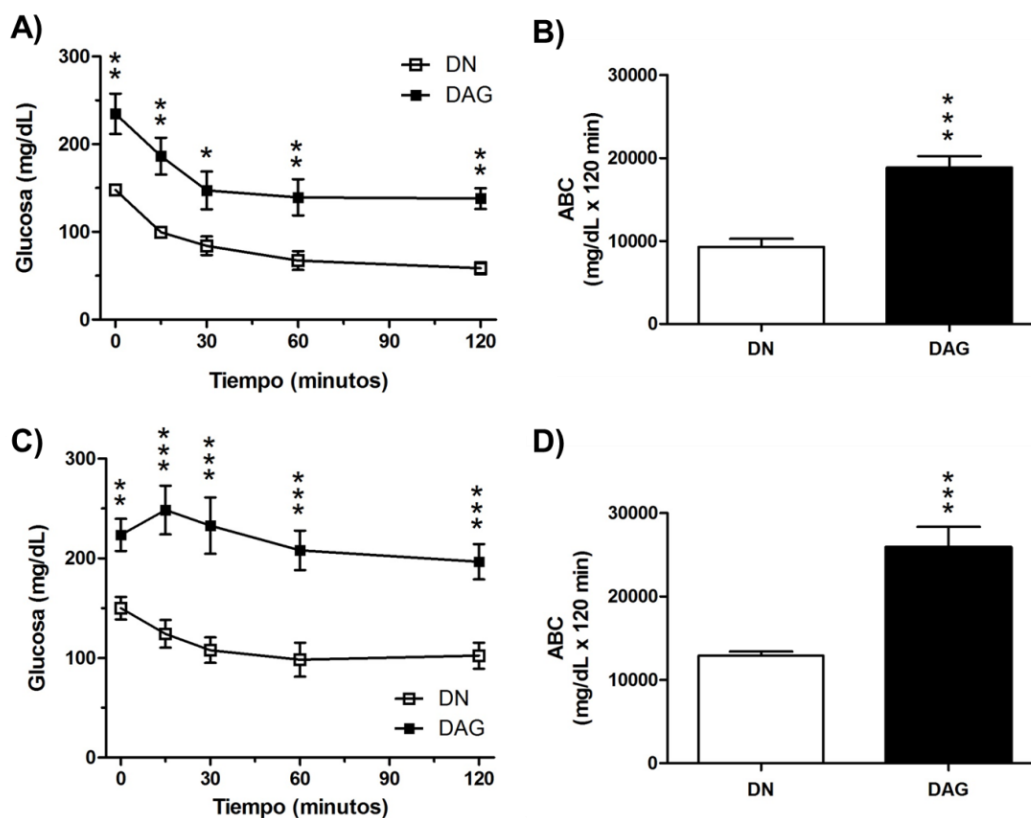


Figura 7 - Prueba de resistencia a la insulina (PRI).

(A y C) PRI en ratones alimentados con una dieta normal (DN) (□) o con una dieta alta en grasa (DAG) (■) del grupo experimental 1 (15 semanas) (A) y del grupo experimental 2 (11 semanas) (C). La gráfica muestra la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1mU/gr de insulina. (B y D) El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 (B) y el grupo 2 (D) de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar (n=5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. DN (ANOVA de 2 vías [A y C] y prueba t de Student [B y D])

El aumento en los niveles de glucosa en sangre que se observó probablemente se deba al estrés que produce la prueba en los ratones ya que la respuesta fue similar a la de ratones que recibieron una inyección intraperitoneal de PBS 1X como control (**Figura 7C y Figura suplementaria 1**). De igual forma, el área bajo la curva entre dietas es significativamente mayor en el grupo alimentado con una DAG ($p < 0.001$) (**Figura 7D**).

Estos resultados indican que después de 16 semanas de ser alimentados con una dieta alta en grasa los ratones del grupo experimental 1 presentaron niveles de glucosa basal elevados y una alteración en la respuesta a glucosa e insulina similares a un estado pre-diabético (García Soidán, 2009; Tabák *et al.*, 2012). Mientras que los ratones del grupo experimental 2 sometidos a una dieta alta en grasa presentaron alteraciones en la regulación de glucosa y resistencia a la insulina, similar al desarrollo de diabetes tipo II. Ya que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa del grupo 1 todavía respondieron a la inyección de insulina, nos sugiere que los ratones podrían presentar cierta plasticidad al ser retados con una dieta alta en grasa a edades jóvenes, lo que explicaría el desarrollo más temprano de la resistencia a la insulina en los ratones del grupo experimental 2.

	Grupo 1			Grupo 2		
	DN	DAG	P	DN	DAG	P
Edad de Inicio	3 - 4 semanas			6 - 7 semanas		
Tiempo en Dieta	16 semanas			13 semanas		
Peso Última Semana	28.6 gr ± 0.55	40.7 gr ± 1.03	P<0.0001	29.4 gr ± 0.51	40.6 gr ± 0.8	P<0.0001
Consumo de Alimento	22.9 gr ± 0.4	19.49 gr ± 0.47	P<0.0001	23.17 ± 0.19	17.5 gr ± 0.14	P<0.0001
Consumo en Kcal	70.98 kcal ± 1.21	102.1 kcal ± 2.48	P<0.0001	71.85 kcal ± 0.61	91.74 kcal ± 0.73	P<0.0001
ABC PTG	25056 ± 2077	40114.5 ± 7547.8	P=0.0005	27563.25 ± 688	57055.5 ± 3187.6	P<0.0001
ABC PRI	25056 ± 2077	42479.25 ± 3828	P=0.0091	12888.75 ± 496	25878 ± 2465	P<0.0001

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos de los ratones alimentados con una dieta normal (DN) o una dieta alta en grasa (DAG) por 16 semanas (Grupo experimental 1) o 13 semanas (Grupo experimental 2).

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO DISMINUYE LA INGESTA, MEJORA LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA Y AUMENTA LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA

A las 16 semanas (Grupo experimental 1) y 13 semanas (Grupo experimental 2) los ratones fueron divididos en dos condiciones habitacionales diferentes: 15 ratones de cada grupo fueron mantenidos en sus jaulas normales (ambiente normal: AN) (**Figura 8A-C**) y los otros 15 ratones fueron sometidos a un paradigma de ambiente enriquecido (AE) (**Figura 8D-G**). El ambiente enriquecido consiste en jaulas de mayor tamaño con túneles, casas de plástico, y juguetes de diferentes tipos y texturas donde se coloca un mayor número de ratones para estimular el componente social. Para mantener el componente de novedad, el arreglo y ubicación de los diferentes objetos en la caja fue modificado cada semana. Los ratones fueron mantenidos en la misma dieta que tenían formando cuatro grupos diferentes: dieta normal en ambiente normal (DN AN), dieta normal en ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en ambiente enriquecido (DAG AE).

Se registró la ganancia de peso en los cuatro grupos por 12 semanas posterior al cambio de ambiente (28 semanas totales) para los ratones del grupo experimental 1. En este grupo no se observó una diferencia en el peso de los ratones en una DN AN y en una DN AE (**Figura 9A**). Por su parte, los ratones en una DAG AN continuaron aumentando de peso a lo largo de las 12 semanas (**Figura 9A**). De forma interesante, al comparar el peso final después de 12 semanas se pudo observar que, a diferencia de los animales del grupo DAG AN, los ratones del grupo DAG AE no presentaron un incremento significativo de peso (**Tabla 3**). De igual forma, se mantuvo el control de la ganancia de peso para el grupo experimental 2 por 12 semanas (25 semanas totales) donde se observó una diferencia significativa en las últimas tres semanas en el peso de los grupos alimentados con una DN, siendo menor en el grupo de ambiente enriquecido (28.88 gr \pm 0.742 DN AE vs. 33.06 gr \pm 1.16 DN AN, $p < 0.01$ semana 25) (**Figura 9B**). Al igual que en el grupo experimental 1, los ratones que se mantuvieron en una DAG AN continuaron aumentando de peso, el cual se mantuvo relativamente similar en las últimas semanas (semana 21 - 27). Adicionalmente, se observó una diferencia en la ganancia de peso en el grupo de DAG AE con respecto al grupo experimental 1, donde los ratones continuaron aumentando de peso hasta alcanzar el peso del grupo en el ambiente normal a la semana 21 (46.75 gr \pm 0.55 DAG AE vs. 46.62 gr \pm 1.04 DAG AN, semana 21) (**Tabla 3**). Estos resultados nos sugieren que el empezar la administración de la dieta alta en grasa a edades diferentes genera variabilidad en la ganancia de peso y en la respuesta al ambiente enriquecido entre nuestros dos grupos experimentales.

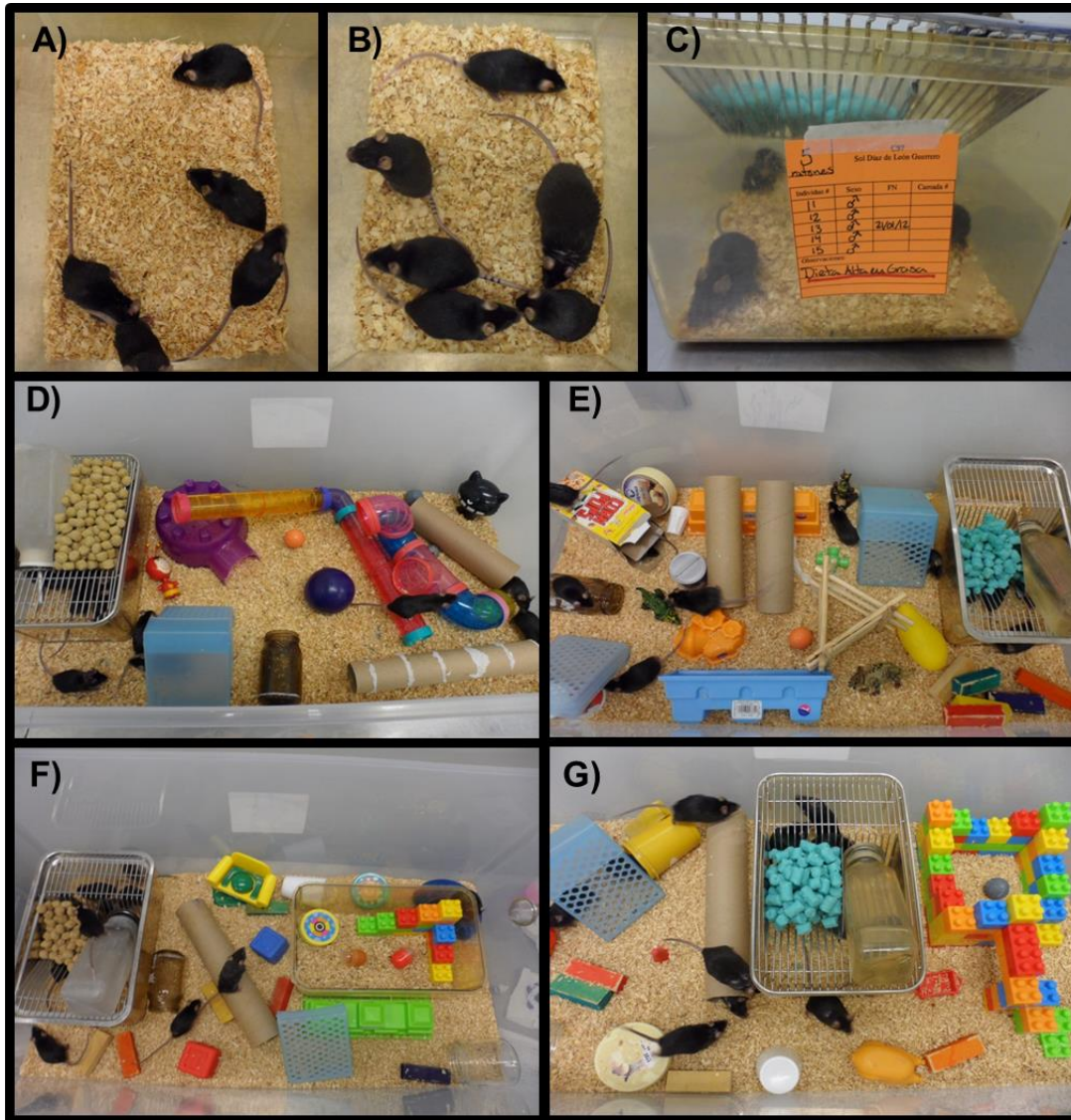


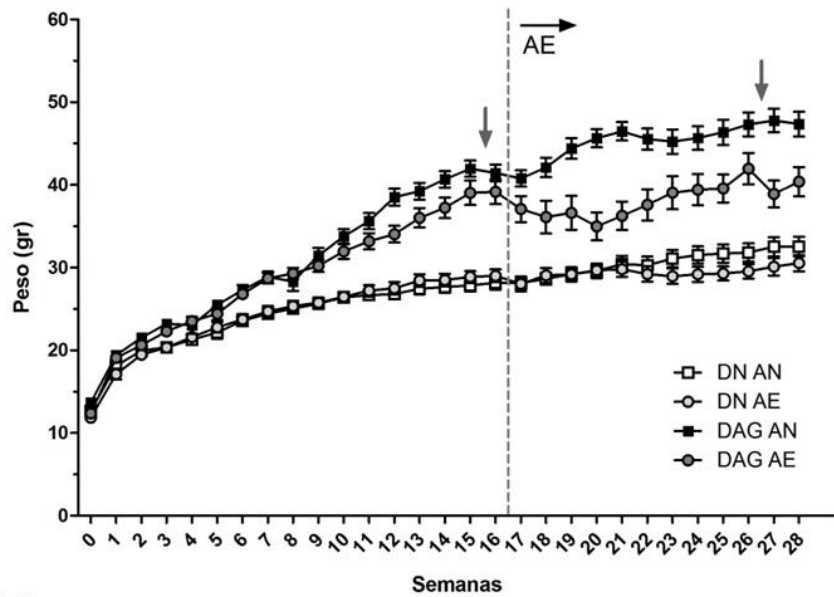
Figura 8 - Condiciones habitacionales normales y ambiente enriquecido

(A, B y C) Fotografías representativas de una caja de ratones en condiciones habitacionales normales alimentados con una dieta normal (DN) (A) o una dieta alta en grasa (DAG) (B y C).

(D, E, F y G) Fotografías representativas de ratones en un ambiente enriquecido del grupo experimental 1 en DN (D) o DAG (E) y del grupo experimental 2 en DN (F) o DAG (G).

Comparando el consumo de comida entre los 4 grupos, podemos observar que los dos grupos alimentados con una dieta normal no mostraron una diferencia significativa en el consumo entre los dos ambientes ($25.73 \text{ gr} \pm 0.5423 \text{ DN AN}$ vs. $24.46 \text{ gr} \pm 0.7535 \text{ DN AE}$ gp1; $23.61 \text{ gr} \pm 0.66 \text{ DN AN}$ vs. $22.7 \text{ gr} \pm 0.46 \text{ DN AE}$ gp2). De forma interesante, observamos que los ratones del grupo DAG AE consumen menos alimento en gramos a la semana en comparación con los grupos de DN y al grupo DAG AN ($22.32 \text{ gr} \pm 1.177 \text{ DAG AN}$ vs. $15.26 \text{ gr} \pm 1.626 \text{ DAG AE}$ $p < 0.001$ gp1; $17.21 \text{ gr} \pm 0.15 \text{ DAG AN}$ vs. $14.99 \text{ gr} \pm 0.48 \text{ DAG AE}$ $p < 0.05$ gp2) (Tabla 3). Esta disminución fue más evidente en los ratones del grupo 1.

A)



B)

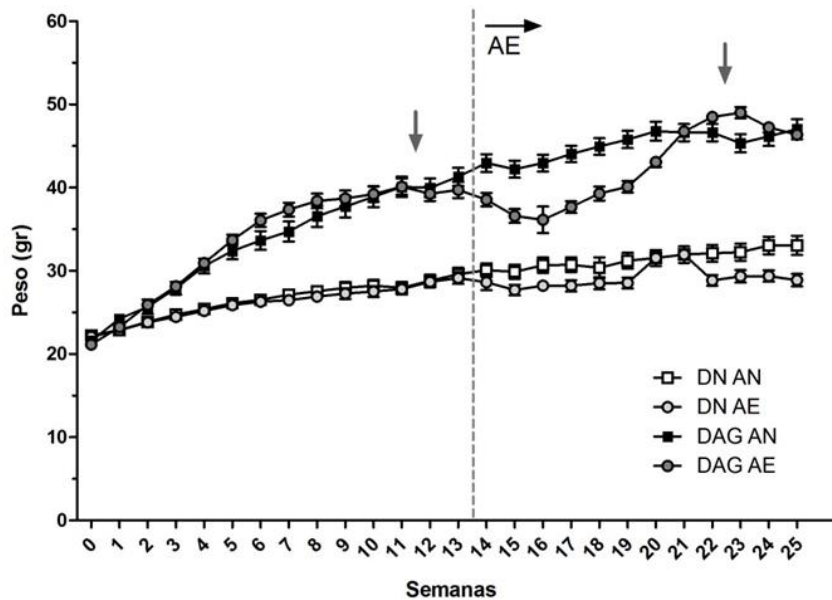


Figura 9 – Ganancia de peso posterior al cambio al ambiente enriquecido

Los ratones alimentados con una dieta normal o una dieta alta en grasa fueron separados después de 16 semanas (Grupo experimental 1) (A) y 13 semanas (Grupo experimental 2) (B) en condiciones habitacionales normales y en un ambiente enriquecido formando 4 grupos: dieta normal ambiente normal (DN AN), dieta normal ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa ambiente enriquecido (DAG AE). Se continuó monitoreando la ganancia de peso durante 12 semanas (28 semanas totales del grupo experimental 1 y 25 semanas totales del grupo experimental 2). En la gráfica se muestra la media de los pesos \pm error estándar (n=14-15), indicando la semana en la cual se realizó el cambio al ambiente enriquecido (flecha horizontal) y las semanas en las que se realizaron las PTG y PRI (flechas verticales).

Al comparar el consumo de kilocalorías entre grupos, observamos que los ratones del grupo DAG AN consumieron una mayor cantidad de kilocalorías a la semana que los grupos sometidos a una DN (79.82 kcal \pm 1.630 DN AN y 76.03 kcal \pm 2.348 DN AE vs. 116.4 kcal \pm 6.240 DAG AN $p < 0.001$ gp1; 73.19 kcal \pm 2.05 DN AN y 70.39 kcal \pm 1.43 DN AE vs. 90.2 kcal \pm 0.76 DAG AN $p < 0.001$ gp2); mientras que los ratones en una DAG AE consumieron significativamente menos kilocalorías a la semana que los ratones en la misma dieta en un ambiente normal (81.02 kcal \pm 8.967 DAG AE vs. 116.4 kcal \pm 6.240 DAG AN $p < 0.001$ gp1; 78.6 kcal \pm 2.51 DAG AE vs. 90.2 kcal \pm 0.76 DAG AN $p < 0.001$ gp2) (**Figura 10B y 10D**). Para el grupo experimental 1 no se observó una diferencia en el consumo en kilocalorías al comparar el grupo DAG AE con los grupos alimentados con una DN (**Figura 10B**), mientras que en el grupo experimental 2 si se observó un consumo mayor en el grupo de DAG AE contra el grupo de DN AE (78.6 kcal \pm 2.51 DAG AE vs. 70.39 kcal \pm 1.43 DN AE $p < 0.05$) (**Figura 10D**).

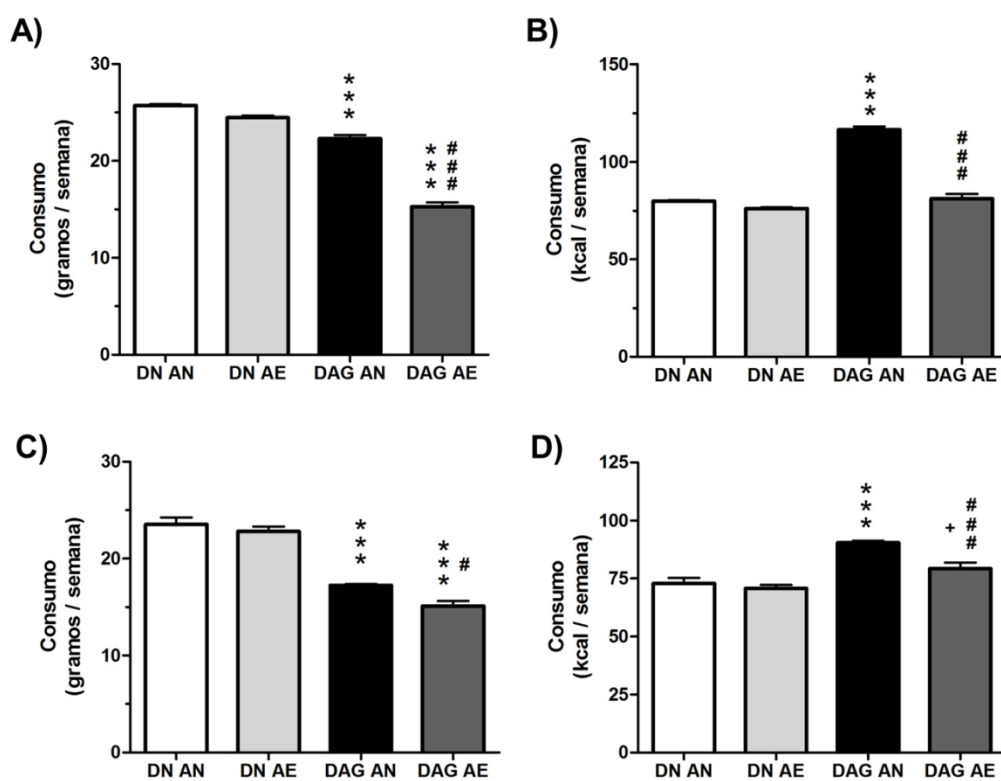


Figura 10 - Consumo semanal de alimento por ratón en el ambiente enriquecido y normal. Consumo de alimento semanal promedio de ratones alimentados con una dieta normal (DN) o con una dieta alta en grasa (DAG) por 12 semanas después de ser separados en un ambiente normal (AN) o en un ambiente enriquecido (AE). El consumo para el grupo experimental 1 (**A y B**) y el grupo experimental 2 (**C y D**) se representa en gramos de alimento (**A y C**) y en kilocalorías (**B y D**). En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=14-15). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (* vs. DN AN y DN AE, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; ANOVA de una vía)

Estos resultados son consistentes con las variaciones de peso, donde se observó que los dos grupos de dieta normal mantuvieron el mismo peso aunque estuvieron sometidos a ambientes diferentes, ya que continuaron consumiendo una cantidad similar de kilocalorías. Por otro lado, los ratones alimentados con una dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido consumieron menos comida y kilocalorías a la semana, lo que puede explicar la disminución de peso observada al comparar con los ratones de la misma dieta en un ambiente normal.

Otro parámetro que indica el estado del metabolismo de glucosa son los niveles basales de glucosa en sangre después de un ayuno (Tabák *et al.*, 2012). Observamos que los ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal presentaron valores similares de glucosa basal entre los diferentes ambientes (**Figura 11A**), mientras que en el grupo experimental 2 los niveles de glucosa basal se encontraron disminuidos en los ratones sometidos a un ambiente enriquecido (**Figura 11B**). La administración de una dieta alta en grasa elevó los niveles de glucosa basal en los ratones en un ambiente normal, que a su vez se encontraron disminuidos en los ratones sometidos a un ambiente enriquecido (DAG AE). Sin embargo, los valores de glucosa en sangre de los ratones DAG AE fueron significativamente mayores a los niveles observados en los ratones alimentados con una dieta normal.

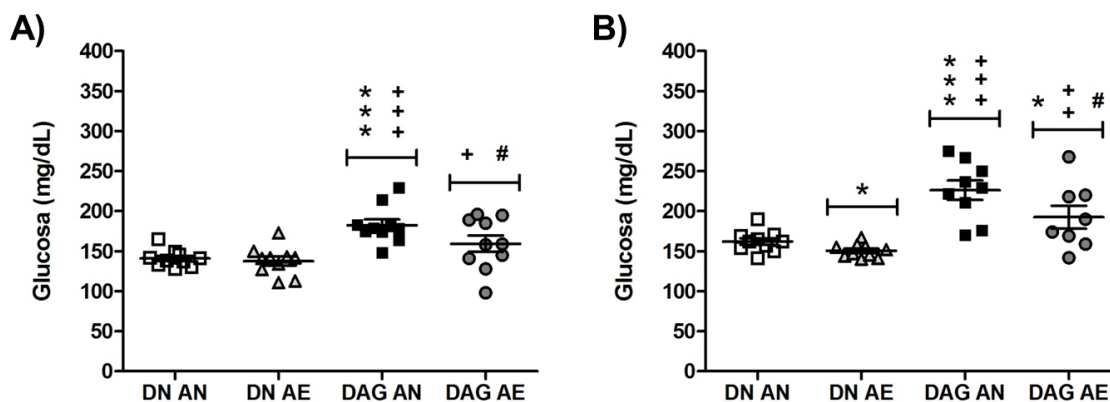


Figura 11 - Niveles de glucosa basal en sangre posterior al cambio al ambiente enriquecido (A y B) Niveles de glucosa en sangre basal de ratones alimentados con una dieta normal (DN) o con una dieta alta en grasa (DAG) del grupo experimental 1 (A) 10 semanas después de ser separados en un ambiente normal (AN) y ambiente enriquecido (AE) (26 semanas totales), y del grupo experimental 2 (B) 9 semanas después de ser separados en un AN y un AE (22 semanas totales). Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas previo al experimento. En las gráficas se muestran los valores de glucosa en sangre de cada individuo, así como la media \pm el error estándar por grupo. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; ANOVA de una vía)

Posteriormente, los ratones fueron sometidos a las pruebas de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina después de 10 semanas (Grupo experimental 1) y 9 semanas

(Grupo experimental 2) de estar en condiciones habitacionales diferentes (26 y 22 semanas totales respectivamente) (**Figura 12 y 13**). Al realizar la prueba de tolerancia a la glucosa observamos respuestas similares para los dos grupos experimentales, donde los 2 grupos de ratones alimentados con una DN tuvieron un comportamiento correcto a un bolo de glucosa, observando un incremento en la glucosa en sangre a los 15 minutos después de los cuales esta disminuyó hasta llegar a los niveles basales (**Figura 12A y 12C**). Sin embargo, la respuesta en los ratones del grupo experimental 2 fue más lenta, lo que se podría explicar por la diferencia en la edad de los ratones entre grupos al inicio del experimento. Por otro lado, los ratones en una DAG AN presentaron una intolerancia a la glucosa ya que después de la inyección de glucosa los niveles en sangre continuaron elevándose hasta los 60 minutos, después de los cuales disminuyeron ligeramente sin acercarse a los niveles basales, lo que nos indica que los ratones ya no están respondiendo correctamente a un bolo de glucosa.

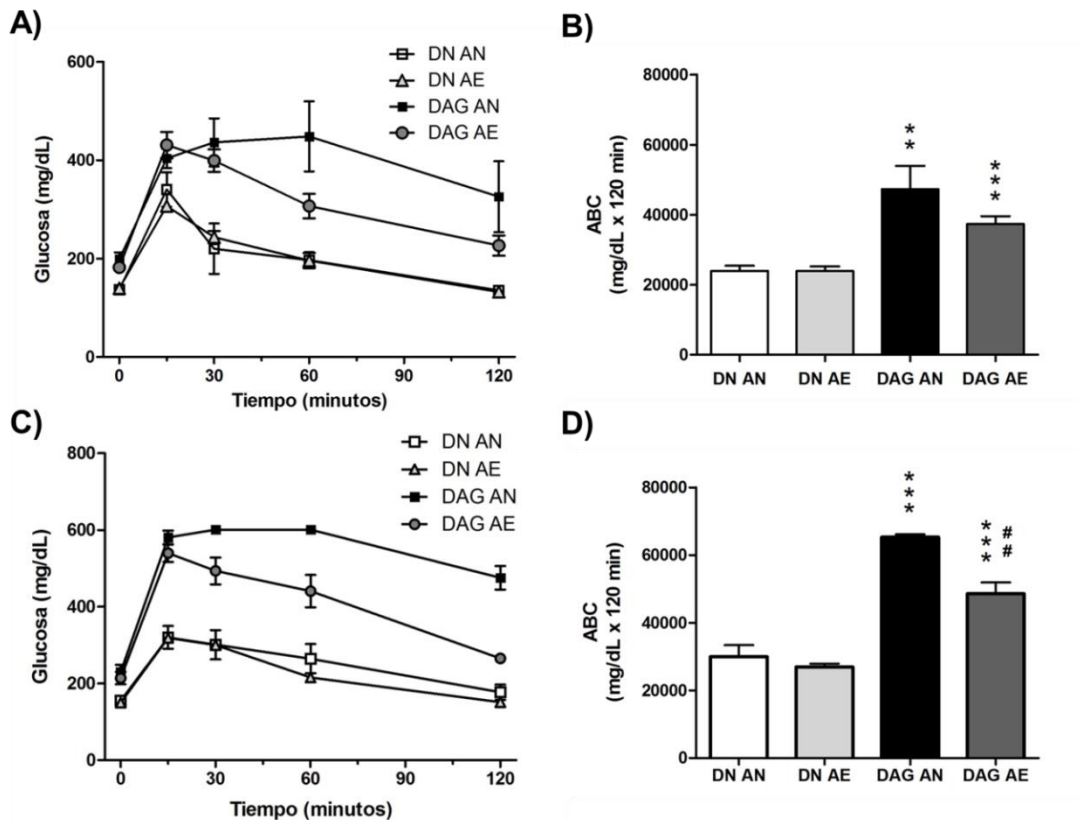


Figura 12 - Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) en animales sometidos a un ambiente normal o enriquecido

(**A y C**) PTG en ratones alimentados con una dieta normal (DN) o con una dieta alta en grasa (DAG) del grupo experimental 1 (**A**) 10 semanas después de ser separados en un ambiente normal (AN) y ambiente enriquecido (AE) (26 semanas totales), y del grupo experimental 2 (**C**) 9 semanas después de ser separados en un AN y un AE (22 semanas totales). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1.8 mg/gr de glucosa. (**B y D**) El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 (**B**) y el grupo 2 (**D**) de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=5). ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN y DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

Interesantemente, observamos que los ratones en una DAG AE todavía son capaces de responder a una inyección de glucosa disminuyendo los niveles de glucosa en sangre a partir de los 30 minutos, aunque esta respuesta se vio alterada ya que los niveles de glucosa fueron mayores a lo largo de toda la curva al comparar con los ratones alimentados con una DN. Al calcular el área total bajo la curva de la concentración de glucosa en sangre, podemos observar que el área de los dos grupos alimentados con una DAG fue significativamente mayor al área de los grupos alimentados con una DN ($p < 0.01$ DAG AN, $p < 0.001$ DAG AE) (**Figura 12B y 12D**). De igual manera, el área bajo la curva de los ratones en una DAG AE fue menor a la de los ratones sometidos en una DAG AN, aunque esta diferencia no es significativa para el grupo experimental 1 probablemente debido a la alta dispersión de los datos de los ratones en un ambiente normal (47295 ± 13351.34 DAG AN vs. 37390.5 ± 4897.33 DAG AE, $p = 0.0819$ gp1), mientras que en el grupo experimental 2 la diferencia entre las áreas si resulta significativamente diferente (65277 ± 859.8 DAG AN vs. 48593 ± 3291 DAG AE $p < 0.01$ gp2) (**Tabla 3**).

Al realizar la prueba de resistencia a la insulina en los dos grupos experimentales, observamos que los ratones alimentados con una DN respondieron a una inyección de insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre (**Figura 13A y 13C**). Sin embargo, observamos diferencias entre los dos grupos alimentados con una DN, donde la disminución en los niveles de glucosa en sangre fue menor en el grupo DN AN en comparación a los del grupo DN AE a lo largo del tiempo. Al calcular el área bajo la curva de estos grupos, observamos que el área de los ratones en una DN AE fue significativamente menor al comparar con el área de los ratones en una DN AN ($p < 0.01$ gp1 y $p < 0.5$ gp2) (**Figura 13B y 13D**). Adicionalmente, observamos un ligero aumento en los niveles de glucosa en sangre en los ratones en una DAG AN después de recibir la inyección intraperitoneal de insulina para los dos grupos experimentales, lo que nos indica que los ratones ya no responden a la señal de insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre (**Figura 13A y 13C**). Por el contrario, los ratones en una DAG AE todavía son capaces de responder a la señal de insulina ya que, en respuesta a la inyección de insulina, disminuyeron los niveles de glucosa en sangre (**Figura 13A y 13C**). De igual manera, el área bajo la curva de los ratones sometidos en una DAG AE fue significativamente menor al comparar con el área de los ratones en una DAG AN ($p < 0.01$) (**Figura 13B y 13D**).

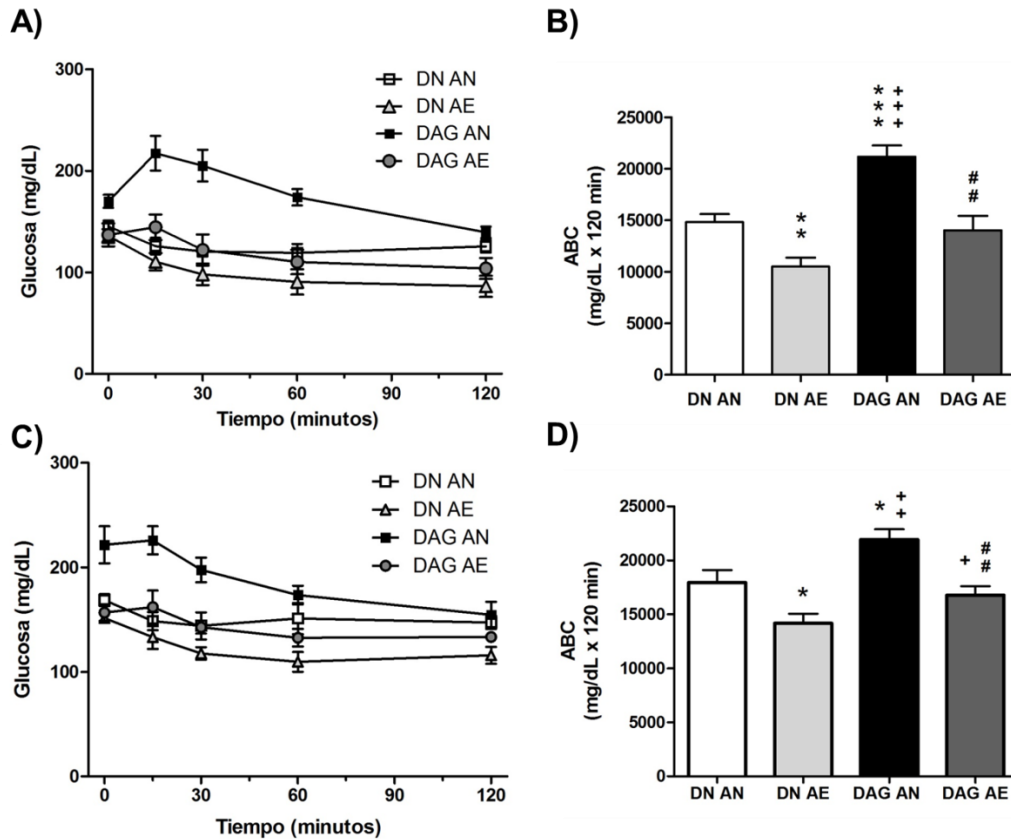


Figura 13 - Prueba de resistencia a la insulina (PRI) en animales expuestos al ambiente enriquecido o normal.

(A y C) PRI en ratones alimentados con una dieta normal (DN) o a una dieta alta en grasa (DAG) del grupo experimental 1 **(A)** 10 semanas después de ser separados a un ambiente normal (AN) y un ambiente enriquecido (AE) (26 semanas totales), y del grupo experimental 2 **(C)** 12 semanas después de ser separados a un AN y un AE (25 semanas totales). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1mU/gr de insulina. **(B y D)** El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 **(B)** y el grupo 2 **(D)** de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=5). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

En conjunto, los resultados de las pruebas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina nos indican que antes del cambio al ambiente enriquecido los ratones alimentados con una dieta alta en grasa presentaron alteraciones en el metabolismo de glucosa (similar a un estado pre diabético para el grupo experimental 1 y al desarrollo de diabetes tipo II para el grupo experimental 2); mientras que las pruebas realizadas después de la división en ambientes indican que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa en un ambiente normal presentan una intolerancia a la glucosa y una resistencia a la insulina (similar al desarrollo de diabetes tipo II). Al realizar las pruebas después de separar a los ratones en diferentes ambientes, observamos que los ratones alimentados con una dieta normal todavía respondieron a las señales de glucosa y de insulina aunque en menor grado a lo observado

previo al cambio de ambiente (**Figuras suplementarias 2 y 3**). Lo anterior es consistente con estudios previos donde observan que la cepa C57BL/6 desarrolla una ligera resistencia a la insulina con la edad (Collins *et al.*, 2004). De manera interesante, los ratones alimentados con una dieta normal sometidos a un ambiente enriquecido presentaron una mayor sensibilidad a la insulina al comparar con los ratones alimentados con la misma dieta en un ambiente normal. Esta respuesta es comparable con la observada en la prueba de resistencia a la insulina realizada antes de la separación en ambientes (**Figura suplementaria 3**). De igual manera, el ambiente enriquecido mejoró significativamente la respuesta a glucosa y a insulina en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, los cuales se comportaron de manera similar a las pruebas realizadas en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa antes de la división en ambientes (**Figuras suplementarias 4 y 5**). Estos datos en conjunto nos sugieren que el ambiente enriquecido es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar el metabolismo de glucosa en ratones alimentados con una dieta normal durante el envejecimiento y en ratones alimentados con una dieta alta en grasa que desarrollan obesidad.

	Grupo 1				Grupo 2			
	DN AN	DN AE	DAG AN	DAG AE	DN AN	DN AE	DAG AN	DAG AE
Tiempo en ambiente	12 semanas (28 semanas totales)				12 semanas (25 semanas totales)			
Peso Inicial	28.2 gr ± 0.8	29.02 gr ± 0.76	41.45 gr ± 1 ***+++	39.17 gr ± 1.5 ***,+++	29.6 gr ± 0.77	29.15 gr ± 0.69	41.32 gr ± 1.09 ***,+++	39.72 gr ± 0.95 ***,+++
Peso Final	32.5 gr ± 1.17	30.54 gr ± 0.98	47.36 gr ± 1.5 ***,+++	40.4 gr ± 1.8 ***,+++;##	33 gr ± 1.16	28.88 gr ± 0.74 **	47 gr ± 1.22 ***+++	46.38 gr ± 0.58 ***,+++
Consumo Alimento	25.7 gr ± 0.16	24.5 gr ± 0.22 ***	22.3 gr ± 0.34 ***,+++	15.3 gr ± 0.47 ***,+++;###	23.6 gr ± 0.66	22.7 gr ± 0.46	17.2 gr ± 0.14 ***,+++	15 gr ± 0.48 ***,+++;#
Consumo Kcal	79.8 kcal ± 0.45	76 kcal ± 0.65	116.4 kcal ± 1.73 ***,+++	81 kcal ± 2.5 ###	73.2 kcal ± 2.05	70.4 kcal ± 1.43	90.2 kcal ± 0.76 ***,+++	78.6 kcal ± 2.5 +,###
Glucosa Basal	140.9 mg/dL ± 3.4	137.6 mg/dL ± 5.7	182.5 mg/dL ± 7.3 ***,+++	159.4 mg/dL ± 10.24 +,#	162 mg/dL ± 4.2	150.5 mg/dL ± 2.7 *	226.3 mg/dL ± 12.2 ***,+++	192.5 mg/dL ± 14.4 *,+;#
ABC PTG	23995.5 ± 1472.5	23911.5 ± 1341.6	47295 ± 6675.7 **,++	37390.5 ± 2190.2 ***,+++	29947.5 ± 3458.4	26893.5 ± 1020	65277 ± 860 ***,+++	48592.5 ± 3291 ***,+++;##
ABC PRI	14821.5 ± 779.8	10494.4 ± 881.6 **	21157.5 ± 1095.1 ***,+++	14010 ± 1413 ##	17944.5 ± 1158	14185.5 ± 878 *	21933.75 ± 953 *,++	16785 ± 828.7 +,##

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos de los ratones alimentados con una dieta normal (DN) o una dieta alta en grasa (DAG) después de ser separados en un ambiente normal (AN) o en un ambiente enriquecido (AE) por 12 semanas. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN)

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO DISMINUYE LA PREVALENCIA DE ESTRUCTURAS DE TIPO CORONA EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA

Los ratones fueron sacrificados a las 28 semanas (grupo experimental 1) y 27 semanas (grupo experimental 2) después de haber iniciado el experimento para obtener sangre, tejido adiposo, hígado, hipotálamo y cerebro completo. Se realizó un análisis histológico de tejido adiposo del grupo experimental 1 para determinar si los ratones sometidos a un ambiente enriquecido presentaban cambios en el tamaño de los adipocitos y en la infiltración de células del sistema inmune (**Figura 14**). Podemos observar que los ratones de los dos grupos a los cuales se les administro una dieta normal presentaron adipocitos de tamaño similar, al igual que poca infiltración de células al tejido adiposo (**Figura 14A y 14B**). Los adipocitos de los ratones en una DAG AN son de mayor tamaño que los de ratones a los cuales se les administró una dieta normal; así mismo, se observó la presencia de estructuras tipo corona de adipocitos rodeados por macrófagos (**Figura 14C**). Al comparar a los ratones en una DAG AN contra los ratones en una DAG AE observamos que el tamaño de los adipocitos fue similar, pero se observó una menor presencia de estructuras de tipo corona en los ratones en un ambiente enriquecido (**Figura 14D**). No observamos diferencias en la morfología del tejido adiposo en los ratones de DN AN y DN AE. Estos resultados sugieren que la administración de una dieta alta en grasa lleva a un aumento en el tamaño de los adipocitos y a la formación de estructuras de tipo corona que corresponden a adipocitos en proceso de muerte rodeados por macrófagos. El ambiente enriquecido no previene el aumento de tamaño de los adipocitos pero disminuye la prevalencia de estructuras de tipo corona. Esto sugiere que el ambiente enriquecido podría estar regulando la activación de vías que promuevan la muerte de adipocitos o la infiltración y diferenciación de macrófagos al tejido adiposo.

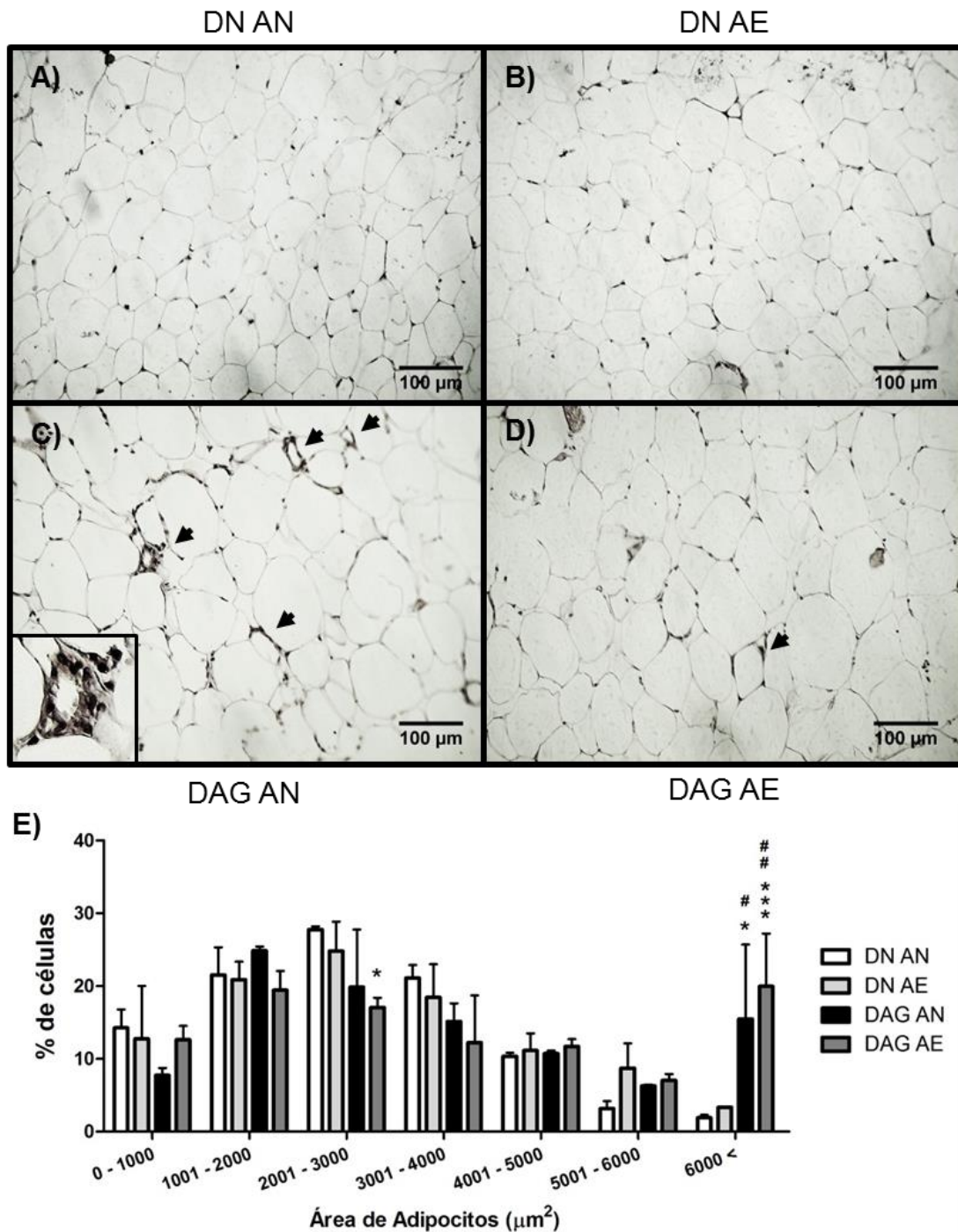


Figura 14 - Histología de tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y en un ambiente enriquecido

A-D) Imágenes representativas de cortes histológicos de tejido adiposo teñidos con hematoxilina y eosina de ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN) **(A)**, con una dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE) **(B)**, con una dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) **(C)** o con una dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) **(D)**. Las flechas indican las estructuras de tipo corona, en **(C)** se muestra un acercamiento de una estructura tipo corona. Las microfotografías fueron tomadas utilizando el objetivo 20X. **E)** Distribución del tamaño de los adipocitos. En la gráfica se muestra el promedio \pm la desviación estándar (n=2) * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, # vs. DN AE; ANOVA de una vía)

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REGULA LA ACTIVACIÓN DE JNK EN HÍGADO

Diferentes estudios han determinado que la obesidad lleva a un estado de inflamación que se caracteriza por la activación de las vías de JNK y NF- κ B/IKK, entre otras, en diferentes tejidos incluyendo hígado, tejido adiposo y páncreas (Arkan *et al.*, 2005; Bashan *et al.*, 2007; Cai, 2009; Sabio and Davis, 2010). Así mismo, se ha determinado que la inhibición de estas vías en diferentes tejidos mejora la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de glucosa (Tuncman *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2001), por lo que decidimos determinar el impacto del ambiente enriquecido sobre el estado de activación de estas vías. Para ello, realizamos ensayos de *Western Blot* a partir de extractos proteicos de hígado. Se determinaron los niveles de fosforilación de la cinasa α/β de I κ B (IKK α/β) como indicador de la activación de la vía de NF- κ B/IKK, al igual que los niveles de fosforilación de la cinasa NH₂-terminal de cJun (JNK) para determinar su activación.

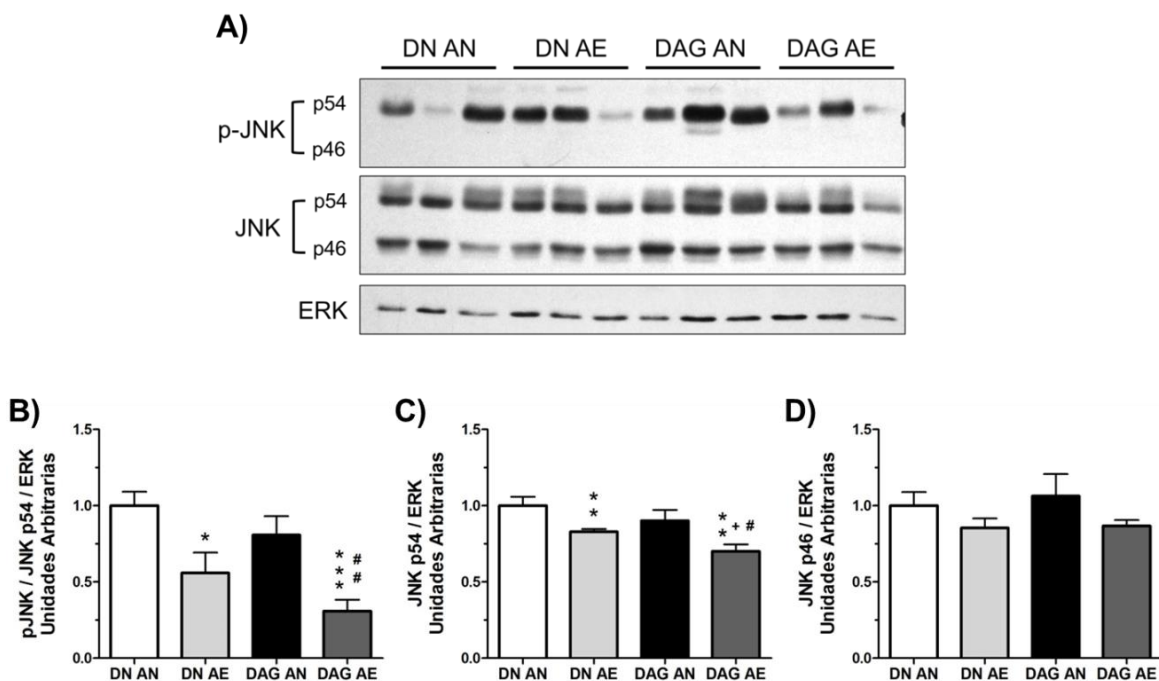


Figura 15 - Activación de la vía de JNK en hígado en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis representativo de *Western Blot* para JNK fosforilado (p-JNK) y JNK total en hígados de ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. **(B-D)** Cuantificación por densitometría de los niveles de fosforilación de la isoforma grande de JNK (p-JNK p54) **(B)**, de los niveles totales de la isoforma grande de JNK (JNK p54) **(C)** y de los niveles totales de la isoforma pequeña de JNK (JNK p46) **(D)**. En las gráficas se muestran medias \pm error estándar (n=6). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

En los extractos proteicos de hígado no logramos observar la presencia de IKK α/β fosforilado (datos no mostrados). Al determinar los niveles de JNK fosforilado (p-JNK) observamos que solo la isoforma grande de JNK (JNK p54) se encuentra fosforilada en hígado, aunque las dos isoformas se observaron en su forma no fosforilada (**Figura 15A, 16A**). Posteriormente, se realizó un análisis de cuantificación por densitometría para comparar los niveles de proteína entre los grupos. En los ratones del grupo experimental 1, observamos menores niveles de p-JNK en los ratones en una DN AE al comparar con el grupo DN AN; de forma similar observamos una menor fosforilación de JNK en los ratones en una DAG AE comparando con el grupo DAG AN y DN AN (**Figura 15B**) (**Tabla 4**). Adicionalmente, observamos niveles disminuidos de JNK p54 total en los dos grupos de ambiente enriquecido (**Figura 15C**), mientras que la isoforma pequeña JNK p46 tiene niveles similares entre los cuatro grupos (**Figura 15D**). Contrario a lo esperado, no observamos un aumento en los niveles de p-JNK o JNK total en los ratones sometidos a una DAG AN. De estos análisis podemos concluir que en el grupo experimental 1, el ambiente enriquecido disminuye los niveles de JNK p54 total y fosforilado en hígado, independientemente de la dieta (DN o DAG) que hayan recibido los ratones.

Los ensayos de *Western Blot* mostraron que en los extractos proteicos de hígado del grupo experimental 2 (**Figura 16A**) los niveles de p-JNK p54 se encuentran aumentados en el grupo DAG AN en comparación con el grupo DN AN, y de forma inesperada encontramos que los grupos DN AE y DAG AE presentan valores aún mayores a los ratones en un ambiente normal (**Figura 16B**) (**Tabla 4**). No se observaron diferencias en los niveles de JNK p54 entre los cuatro grupos (**Figura 16C**), mientras el grupo de DAG AE presentó niveles disminuidos de JNK p46 al ser comparado con el grupo DN AN (**Figura 16D**). Estos resultados sugieren que en el grupo experimental 2 el ambiente enriquecido aumenta los niveles de p-JNK en hígado, lo que difiere con los resultados obtenidos para el grupo experimental 1 (**Figura 15B**), y disminuye los niveles de JNK p46 en los ratones a los que se les administró una dieta alta en grasa. En el grupo experimental 2 también fue evidente que los niveles de la cinasa ERK (utilizada como control de carga) parecieran estar variando entre los 4 grupos (**Figura 16A**), lo que podría estar afectando los valores de densitometría.

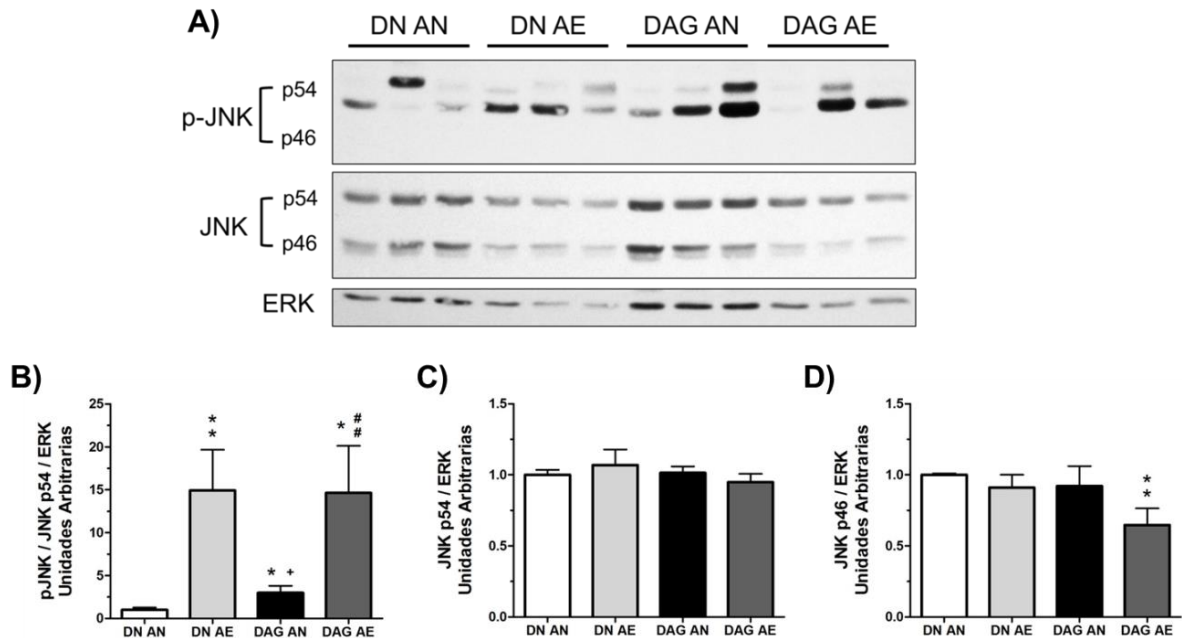


Figura 16 - Activación de la vía de JNK en hígado en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis representativo de *Western Blot* para JNK fosforilado (p-JNK) y JNK total en hígados de ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. **(B-D)** Cuantificación por densitometría de los niveles de fosforilación de la isoforma grande de JNK (p-JNK p54) **(B)**, de los niveles totales de la isoforma grande de JNK (JNK p54) **(C)** y de la isoforma pequeña de JNK (JNK p46) **(D)**. En las gráficas se muestran medias \pm error estándar (n=6). * P<0.05, ** P<0.01 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE JNK E IKK EN EL HIPOTÁLAMO

La administración de una dieta alta en grasa también lleva a la activación de las vías de JNK y NF- κ B/IKK en el hipotálamo (De Souza *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008), lo que lleva al desarrollo de resistencia a la leptina y a la insulina en esta región del cerebro. De igual manera, la delección de JNK1 o de IKK β en neuronas y en el hipotálamo, lleva a una disminución en la ingesta y aumenta la sensibilidad a la insulina (Belgardt *et al.*, 2010; Benzler *et al.*, 2013; Posey *et al.*, 2009; Sabio *et al.*, 2010), por lo que decidimos determinar la activación de estas vías en el hipotálamo en nuestras condiciones experimentales.

En los extractos proteicos de hipotálamo del grupo experimental 1 **(Figura 17A)**, podemos observar que los ratones en una DAG AE presentan menores niveles de IKK α / β fosforilados (p-IKK) al comparar con el grupo de DAG AN y DN AE **(Figura 17B)**. En cuanto a

los niveles de p-JNK p54 observamos una gran variabilidad en los valores de densitometría de cada grupo lo que no nos permite determinar diferencias entre los grupos (**Figura 17C**). Adicionalmente, observamos menores niveles de p-JNK p46 en los grupos de DN AE y DAG AN al ser comparados con el grupo DN AN (**Figura 17D**), mientras que detectamos niveles similares de JNK total entre los cuatro grupos (**Figura 17E y 17F**).

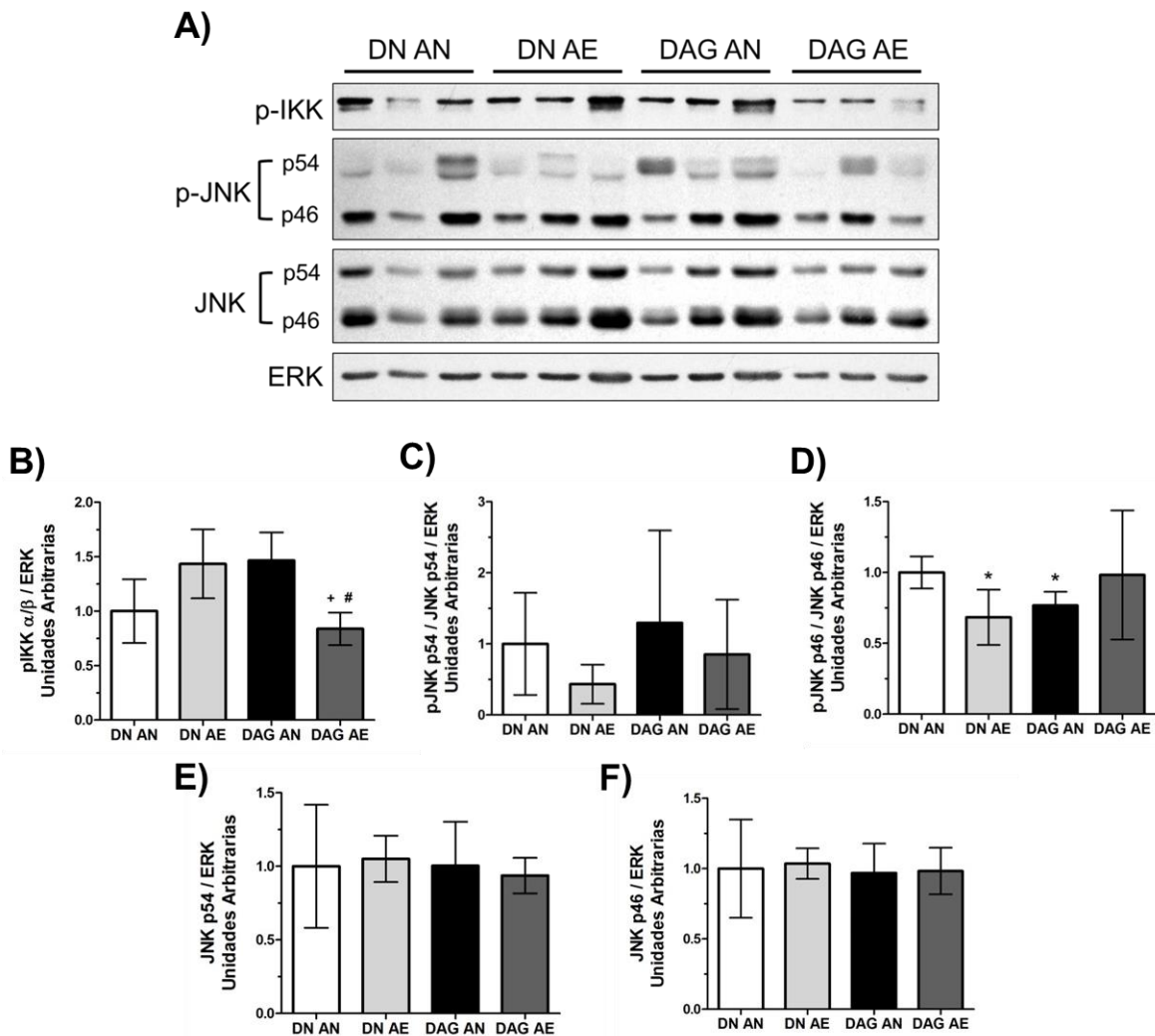


Figura 17 - Activación de la vía de IKK y de JNK en hipotálamo en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis de *Western Blot* para IKK α/β fosforilado (p-IKK), JNK fosforilado (p-JNK) y JNK total en hipotálamos de ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. **(B-F)** Cuantificación por densitometría de los niveles de fosforilación de de IKK α/β (p-IKK) **(B)**, de fosforilación de la isoforma grande de JNK (p-JNK p54) **(C)**, de fosforilación de la isoforma pequeña de JNK (p-JNK p46) **(D)**, de los niveles totales JNK p54 **(E)** y de JNK p46 **(F)**. En las gráficas se muestran medias \pm desviación estándar (n=3). * P<0.05 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

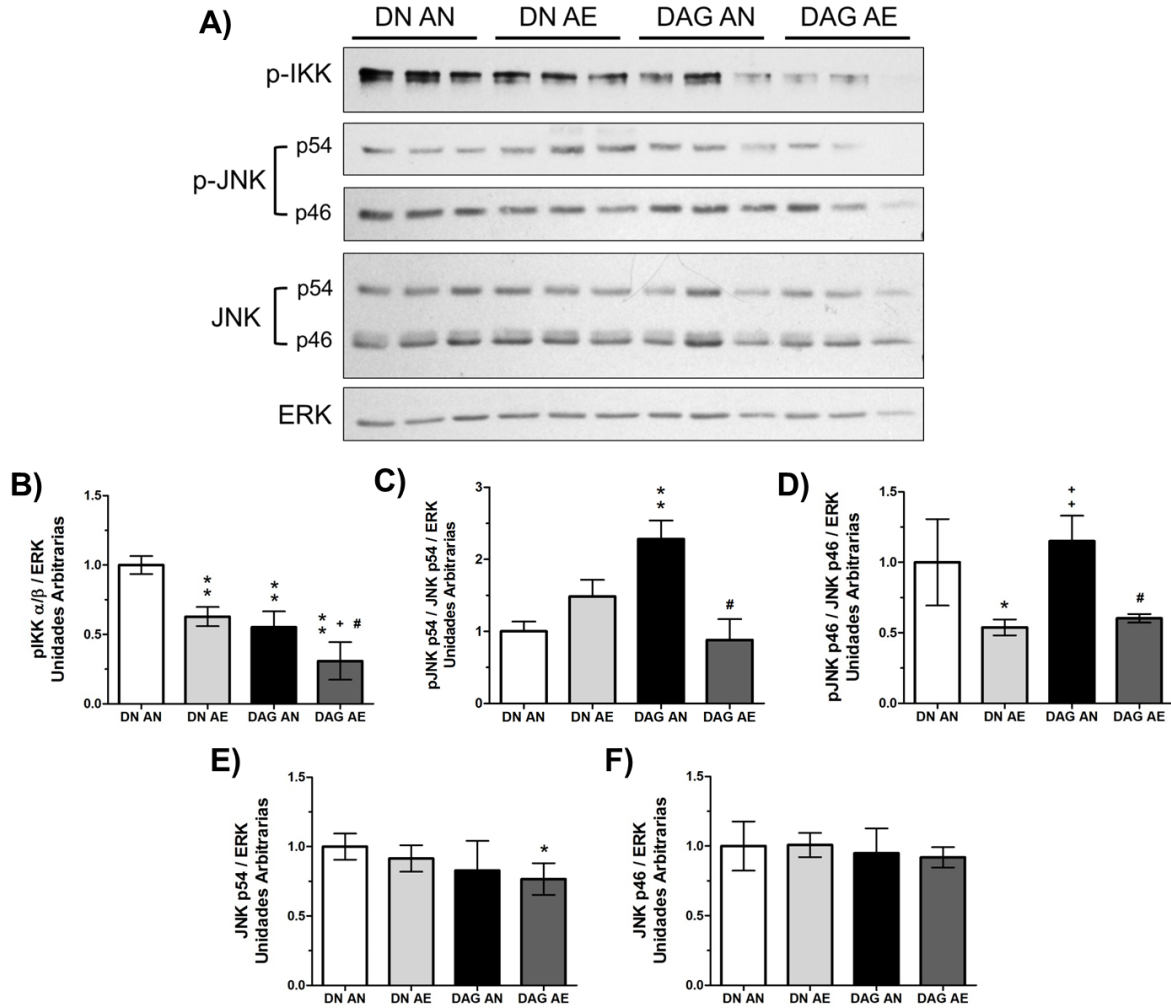


Figura 18 - Activación de la vía de IKK y de JNK en hipotálamo en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis de *Western Blot* para IKK α/β fosforilado (p-IKK), JNK fosforilado (p-JNK) y JNK total en hipotálamos de ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. **(B-F)** Cuantificación por densitometría de los niveles de fosforilación de de IKK α/β (p-IKK) **(B)**, de fosforilación de la isoforma grande de JNK (p-JNK p54) **(C)**, de fosforilación de la isoforma pequeña de JNK (p-JNK p46) **(D)**, de los niveles totales JNK p54 **(E)** y de JNK p46 **(F)**. En las gráficas se muestran medias \pm desviación estándar (n=3). * P<0.05, ** P<0.01 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

Al determinar la activación de estas vías en los extractos proteicos de hipotálamo del grupo experimental 2 (**Figura 18A**), los resultados mostraron una disminución en los niveles de p-IKK en los grupos DN AE y DAG AN al comparar con el grupo DN AN, mientras que el grupo DAG AE muestra niveles inferiores al comparar con los otros tres grupos (**Figura 18B**). En cuanto a los niveles de p-JNK p54, observamos un aumento significativo en el grupo DAG AN al compararlo con los ratones en una DN AN, los cuales se ven disminuidos en los ratones

en una DAG AE (**Figura 18C**). Adicionalmente, observamos que los niveles p-JNK p46 disminuyen en ambos grupos de ambiente enriquecido al comparar con los grupos de ambiente normal en la misma dieta (DN AE vs. DN AN y DAG AE vs. DAG AN) (**Figura 18D**) (**Tabla 4**). Finalmente, no se observaron diferencias en los niveles totales de las dos isoformas de JNK entre los cuatro grupos (**Figura 18E y 18F**). En conjunto, los resultados de los dos grupos experimentales sugieren que en el hipotálamo la administración de una dieta alta en grasa eleva los niveles de fosforilación de JNK p54, y que estos disminuyen en respuesta a un ambiente enriquecido, mientras que el ambiente enriquecido disminuye los niveles de p-IKK y de p-JNK p46 en ratones sometidos a una dieta normal y a una dieta alta en grasa.

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO INDUCE MOLECULAS IMPORTANTES PARA EL FUNCIONAMIENTO NEURONAL

Diferentes estudios han determinado que el ambiente enriquecido lleva a un aumento en los niveles de ARN mensajero del factor de transcripción c-Fos y en los niveles proteicos de la neurotrofina BDNF en diferentes regiones del cerebro (Ali *et al.*, 2009; Bakos *et al.*, 2009; Ickes *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001), lo que es indicativo de un aumento en la actividad neuronal. BDNF es sintetizado como un precursor (pre-proBDNF) que rápidamente sufre un corte proteolítico para dar lugar a proBDNF (32kDa). proBDNF puede ser procesado intracelularmente por diferentes enzimas y ser secretado en su forma madura de 14kDa, o puede ser secretado como pro-BDNF y luego cortado por proteasas extracelulares (Cunha *et al.*, 2010), por lo que las dos formas tienen relevancia biológica. Dados estos antecedentes, decidimos determinar los niveles de c-Fos, pro-BDNF y BDNF para determinar si el ambiente enriquecido favorece la activación del hipotálamo en nuestras condiciones experimentales.

En los extractos proteicos de hipotálamo del grupo experimental 1 podemos observar una disminución en los niveles de c-Fos y de proBDNF en los ratones en una DAG AN al comparar con los ratones sometidos a una DN AN y DN AE (**Figura 19B y 19C**). Adicionalmente, observamos un aumento en los niveles de BDNF maduro (BDNF) en los ratones en un ambiente enriquecido al comparar con los ratones en un ambiente normal que consumían la misma dieta (DN AE vs. DN AN y DAG AE vs. DAG AN) (**Tabla 4**), siendo este aumento más evidente en el grupo DAG AE (**Figura 19D**). Al determinar los niveles totales de BDNF (proBDNF + BDNF) observamos una disminución significativa en los ratones sometidos a una DAG AN, mientras que los ratones en una DAG AE no presentaron esta disminución (**Figura 19E**).

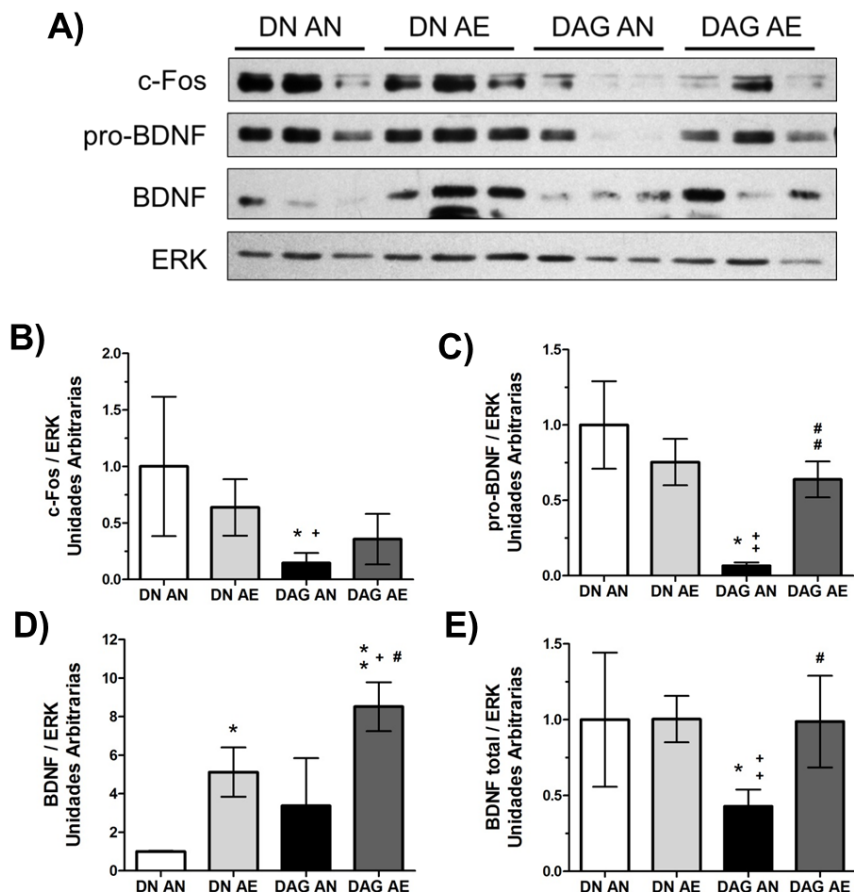


Figura 19 - Niveles de c-Fos y BDNF en el hipotálamo en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis de *Western Blot* para c-Fos, proBDNF y BDNF en hipotálamos de ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. **(B-E)** Cuantificación por densitometría de los niveles de c-Fos **(B)**, de proBDNF **(C)**, de BDNF maduro (BDNF) **(D)**, y de BDNF total (pro-BDNF + BDNF) **(E)**. En las gráficas se muestran medias \pm desviación estándar (n=3). * P<0.05, ** P<0.01 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

En el grupo experimental 2 (**Figura 20A**), observamos una disminución en los niveles proteicos de c-Fos y de proBDNF en el hipotálamo de los ratones en una DAG AN en comparación con los hipotálamos de ratones alimentados con una dieta normal, que es revertida en los ratones en una DAG AE (**Figura 20B y 20C**). Sin embargo, aún falta por determinar los niveles de BDNF maduro utilizando geles de poliacrilamida de mayor porcentaje para separar BDNF (14 KDa) del frente del gel (**Figura 20A**). Independiente de esto, los resultados sugieren que la administración de una dieta alta en grasa disminuye los niveles de BDNF y c-Fos en el hipotálamo, mientras que el ambiente enriquecido impide o revierte esta disminución y pareciera aumentar el procesamiento de pro-BDNF a BDNF, ya que los niveles de BDNF total no se ven alterados.

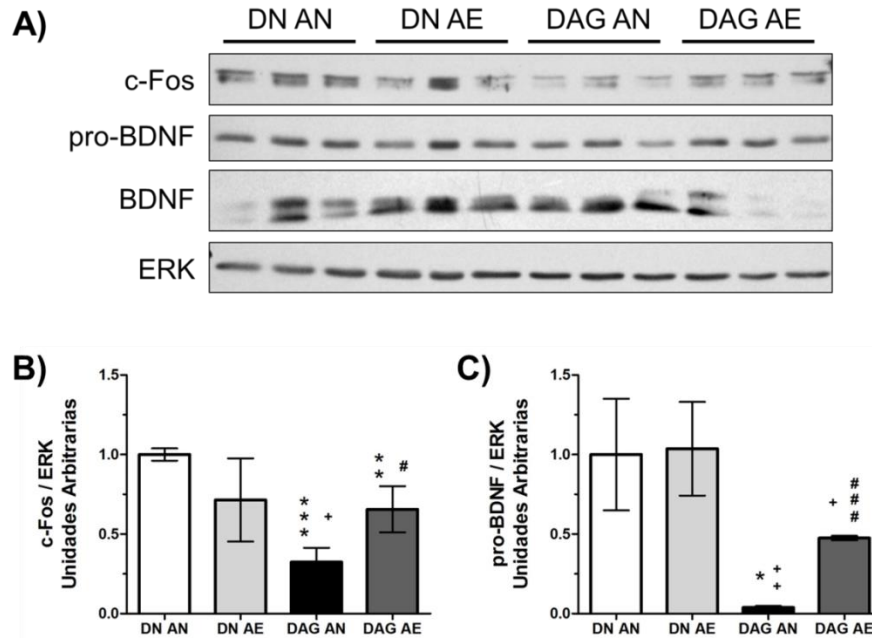


Figura 20 - Niveles de c-Fos y BDNF en el hipotálamo en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis de *Western Blot* para c-Fos, proBDNF y BDNF en hipotálamos de ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta normal en un ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. **(B-C)** Cuantificación por densitometría de los niveles de c-Fos **(B)**, y de proBDNF **(C)**. En las gráficas se muestran medias \pm desviación estándar (n=3). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN; prueba t de Student)

ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

La activación de las vías de IKK y JNK lleva a la inhibición de la vía de señalización de insulina (Aguirre *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002), por lo que realizamos un análisis de los niveles de fosforilación de AKT (p-AKT) como indicador de la activación de esta vía en el hipotálamo **(Figura 21A)**. Previo al sacrificio, los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas donde un subconjunto de ratones de cada grupo recibió una inyección intraperitoneal de insulina (1mU/gr) 5 minutos antes del sacrificio. Posteriormente se colectaron los hipotálamos para obtener extractos proteicos.

Considerando únicamente los ratones sin inyección de insulina, podemos observar que los animales en un ambiente enriquecido presentaron niveles basales de p-AKT elevados al comparar con los ratones en un ambiente normal **(Figura 21B)**. Al ver la activación de p-AKT en respuesta a una inyección de insulina (normalizando los valores de cada grupo con

respecto a los niveles de p-AKT basal) observamos un aumento en p-AKT en los grupos DN AN y DAG AN, que no fue observado en los ratones de los grupos de ambiente enriquecido (**Figura 21C**). Estos resultados sugieren que el ambiente enriquecido incrementa los niveles basales de p-AKT, lo que podría indicar una mejor activación de la vía de señalización de insulina. Contrario a lo esperado, observamos una inducción en los niveles de AKT fosforilado en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa en un ambiente normal (**Figura 21B**).

Esto sugiere que, aunque observamos una resistencia a la insulina en las pruebas, el hipotálamo todavía es capaz de responder a la inyección de insulina para activar a AKT. Aun así, faltaría hacer más pruebas para determinar el estado de activación del resto de la vía de señalización de insulina (por ejemplo, los niveles de fosforilación de IRS) y si esta se encuentra inhibida en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

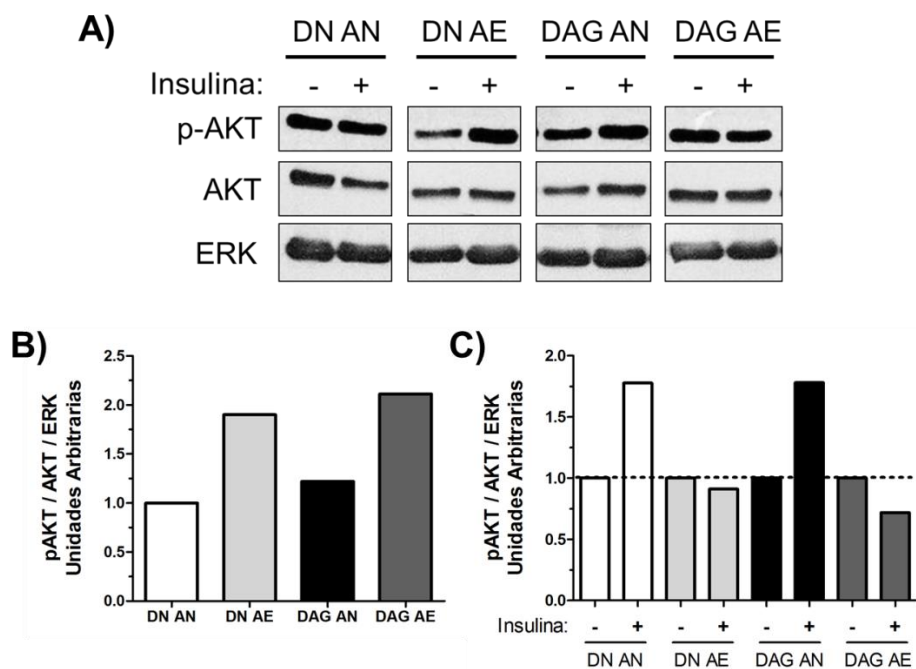


Figura 21 - Activación de la vía de AKT en el hipotálamo en respuesta a una dieta alta en grasa y a un ambiente enriquecido

A) Análisis de *Western Blot* para AKT fosforilado (p-AKT) y AKT total en hipotálamos de ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal en ambiente normal (DN AN), dieta normal en un ambiente enriquecido (DN AE), dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) y dieta alta en grasa en un ambiente enriquecido (DAG AE) utilizando ERK como control de carga. Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas y fueron divididos en dos grupos: sin tratamiento (-) y con una inyección de 1mU/gr de insulina 5 minutos previo al sacrificio (+). **(B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de fosforilación de AKT en hipotálamo de ratones en ayuno (p-AKT basal). **(C)** Cuantificación por densitometría de los niveles de p-AKT en hígado en respuesta a una inyección de insulina, normalizando los valores de cada grupo con los niveles de p-AKT basal (n=1).

		Grupo 1				Grupo 2			
		DN AN	DN AE	DAG AN	DAG AE	DN AN	DN AE	DAG AN	DAG AE
Hígado	p-JNK p54	1 ± 0.09	0.56 ± 0.13 *	0.8 ± 0.12	0.3 ± 0.075 **; ##	1 ± 0.25	14.91 ± 4.74 **	2.97 ± 0.84 *; +	14.64 ± 5.47 *; ##
	JNK p54	1 ± 0.06	0.83 ± 0.02 **	0.90 ± 0.07	0.70 ± 0.04 **; +; #	1 ± 0.03	1.07 ± 0.11	1.01 ± 0.05	0.95 ± 0.06
	JNK p46	1 ± 0.09	0.85 ± 0.06	1.06 ± 0.14	0.87 ± 0.04	1 ± 0.01	0.91 ± 0.09	0.92 ± 0.14	0.65 ± 0.12 **
Hipotálamo	p-IKK	1 ± 0.2	1.43 ± 0.18	1.46 ± 0.15	0.83 ± 0.09 +; #	1 ± 0.05	0.63 ± 0.04 **	0.55 ± 0.065 **	0.31 ± 0.08 **; +; #
	p-JNK p54	1 ± 0.41	0.43 ± 0.16	1.3 ± 0.75	0.42 ± 0.24	1 ± 0.14	1.48 ± 0.23	2.28 ± 0.36 **	0.88 ± 0.29 #
	p-JNK p46	1 ± 0.065	0.68 ± 0.11 *	0.77 ± 0.05 *	0.98 ± 0.26	1 ± 0.18	0.54 ± 0.03 *	1.15 ± 0.13 ++	0.60 ± 0.02 #
	JNK p54	1 ± 0.24	1.05 ± 0.09	1 ± 0.17	0.94 ± 0.07	1 ± 0.05	0.91 ± 0.055	0.83 ± 0.12	0.77 ± 0.065 *
	JNK p46	1 ± 0.2	1.035 ± 0.06	0.97 ± 0.12	0.98 ± 0.095	1 ± 0.1	1.00 ± 0.05	0.95 ± 0.1	0.92 ± 0.04
	c-Fos	1 ± 0.36	0.64 ± 0.14	0.145 ± 0.05 *; +	0.36 ± 0.13	1 ± 0.02	0.71 ± 0.15	0.32 ± 0.05 **; +	0.66 ± 0.08 **; #
	pro-BDNF	1 ± 0.17	0.75 ± 0.09	0.065 ± 0.02 *; ++	0.64 ± 0.07 ##	1 ± 0.2	1.04 ± 0.17	0.04 ± 0.009 *; ++	0.475 ± 0.01 +; ###
	BDNF	1 ± 0.04	5.12 ± 0.74 *	3.37 ± 1.42	8.5 ± 1.27 **; +; #	ND	ND	ND	ND
	BDNF total	1 ± 0.25	1 ± 0.09	0.43 ± 0.06 *; ++	0.99 ± 0.17 #	ND	ND	ND	ND

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos de los ensayos de *Western Blot* de los ratones alimentados con una dieta normal (DN) o una dieta alta en grasa (DAG) después de ser separados en un ambiente normal (AN) o en un ambiente enriquecido (AE) por 12 semanas. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN AN, + vs. DN AE, # vs. DAG AN)

En conjunto nuestros resultados nos sugieren que el ambiente enriquecido disminuye la activación de las vías de IKK y de JNK, y previene la disminución en los niveles de c-Fos y BDNF en el hipotálamo causada por la administración de una dieta alta en grasa. A nivel hepático, la respuesta fue más compleja y no fue consistente entre los dos grupos experimentales, por lo que habría que realizar más pruebas para determinar la activación de estas vías en la periferia.

DISCUSIÓN

La obesidad y la diabetes tipo II son un problema creciente de salud que afecta la calidad de vida de muchas personas a nivel mundial. El consumo de un exceso de nutrientes, en especial una dieta alta en grasa, genera un estado de inflamación crónica de baja intensidad que tiene un papel directo en la inhibición de las vías de señalización de insulina y de leptina en el hipotálamo, lo que altera la homeostasis energética del organismo. Diferentes estudios han determinado que la exposición a un ambiente enriquecido favorece la activación del hipotálamo y puede alterar elementos de la respuesta inmune. Cao y colaboradores (Cao *et al.*, 2011) demostraron que los ratones sometidos a un ambiente enriquecido presentan una menor ganancia de peso al ser alimentados con una dieta alta en grasa. En ese estudio los ratones fueron sujetos al ambiente enriquecido y alimentados con una dieta alta en grasa desde las 3 semanas de edad, lo que muestra un papel preventivo del ambiente enriquecido en el desarrollo de obesidad (Cao *et al.*, 2011). Nosotros quisimos determinar si el ambiente enriquecido era capaz de activar la función homeostática del hipotálamo una vez que ya se ha establecido una condición de obesidad y una alteración del metabolismo de glucosa debido a la administración de una dieta alta en grasa.

Para probar nuestra hipótesis utilizamos un modelo murino de obesidad y diabetes tipo II inducido por dieta, en el cual administramos una dieta alta en grasa a ratones por 3 o 4 meses para generar obesidad y alteraciones en el metabolismo de glucosa, utilizando ratones alimentados con una dieta normal como control. Posteriormente, los ratones fueron divididos en un ambiente normal o un ambiente enriquecido por 3 meses adicionales para valorar sus efectos. En nuestras condiciones logramos validar nuestro modelo experimental, recapitulando los resultados obtenidos en diferentes estudios donde muestran que la administración de una dieta alta en grasa genera un aumento en el peso, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Collins *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2003).

De acuerdo con nuestra hipótesis, observamos que someter a ratones obesos a un ambiente enriquecido mejora la homeostasis de glucosa y la sensibilidad a la insulina. A pesar de que observamos una disminución de peso en las primeras semanas en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa después de que fueron cambiados a un ambiente enriquecido, los ratones continuaron aumentando de peso aun cuando consumían menos cantidad de calorías a la semana que los ratones en un ambiente normal. Interesantemente, observamos que los ratones alimentados con una dieta normal en un ambiente enriquecido

presentaron mayor sensibilidad a la insulina que los ratones en un ambiente normal, los cuales desarrollan una ligera resistencia a la insulina con la edad (Collins *et al.*, 2004). Nosotros no observamos una disminución en el peso de los ratones sometidos a un ambiente enriquecido en una dieta normal a diferencia de lo reportado en otros estudios (Cao *et al.*, 2011), lo que probablemente se deba a la ausencia de ruedas de ejercicio en nuestras condiciones de ambiente enriquecido. Estos resultados nos sugieren que bajo nuestras condiciones experimentales, el ambiente enriquecido es capaz de mejorar la homeostasis de la glucosa y aumentar la sensibilidad a la insulina de forma independiente a la pérdida o ganancia de peso en los ratones.

En el tejido adiposo observamos un aumento en el área de los adipocitos, además de una mayor infiltración de células y la presencia de estructuras tipo corona en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, como ha sido reportado en otros estudios (Park *et al.*, 2010; Strissel *et al.*, 2007; Weisberg *et al.*, 2003). De manera interesante, nuestros datos muestran que el ambiente enriquecido disminuye la prevalencia de estructuras tipo corona en el tejido adiposo de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Sin embargo, no observamos una disminución en el tamaño de los adipocitos ni en la infiltración de células al tejido adiposo respecto a los ratones alimentados con una dieta normal. Diferentes estudios han determinado que un estado de obesidad favorece la infiltración de células del sistema inmune al tejido adiposo y su activación hacia fenotipos inflamatorios (Ji *et al.*, 2012; Lumeng *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2009; Zeyda *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha determinado que el ambiente enriquecido tiene un efecto en diferentes células del sistema inmune incluyendo una mayor activación de células NK y a la activación alterna de microglia (macrófagos residentes del sistema nervioso) mediada por IL-4 (Cao *et al.*, 2010; Ziv *et al.*, 2006). Resultaría interesante evaluar la proporción y el tipo de células infiltradas en el tejido adiposo de los ratones en un ambiente enriquecido alimentados con una dieta alta en grasa, ya que otros estudios han observado que una mayor actividad de células NKT y la activación de macrófagos con IL-4 hacia un fenotipo M2, que secreta un perfil de citocinas anti-inflamatorio, aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye la ganancia de peso y los niveles de leptina en sangre (Ji *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2012; Odegaard *et al.*, 2008); lo que podría explicar nuestros resultados. Adicionalmente sería interesante evaluar los niveles de citocinas en sangre con el objeto de determinar si en nuestras condiciones experimentales el ambiente enriquecido es capaz de disminuir los niveles de citocinas pro-inflamatorias descritas durante la obesidad (Leptina, TNF- α , IL-1 β e IL-6) (Hotamisligil *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2010) y a su

vez, aumentar los niveles de marcadores anti-inflamatorios (adiponectina, IL-4 e IL-10). Por tanto, se requieren más estudios para determinar el mecanismo que conlleva a la disminución de la formación de estructura de tipo corona, ya sea por un menor reclutamiento y diferenciación de macrófagos o por una disminución en la muerte de adipocitos. Contrario a lo descrito por Cao y colaboradores (Cao *et al.*, 2011), no observamos algún cambio en el color o en la morfología del tejido adiposo que nos pudiera indicar una diferenciación del tejido adiposo blanco a tejido adiposo pardo en los ratones sometidos a un ambiente enriquecido. Esto podría deberse a la ausencia de ruedas de ejercicio en nuestro modelo de ambiente enriquecido, o al tipo de tejido adiposo analizado.

La activación de las vías de señalización de IKK y de JNK tiene un papel directo en la inhibición de la señalización de insulina en diferentes tejidos (Aguirre *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002). A su vez, se ha determinado que la inhibición o delección de IKK β o JNK1 en neuronas del hipotálamo genera una disminución en la ingesta de alimento y aumenta el gasto energético y la sensibilidad a insulina en ratones obesos (Belgardt *et al.*, 2010; Sabio *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008), por lo que decidimos evaluar el efecto del ambiente enriquecido sobre la activación de estas vías de señalización. En nuestras condiciones experimentales no logramos observar la activación de IKK α/β en hígado en respuesta a una dieta alta en grasa reportada en otros estudios (Cai *et al.*, 2005), por lo que habría que utilizar otro marcador para poder evaluar la activación de esta vía. Con respecto a la vía de JNK, los resultados obtenidos en hígado no fueron concluyentes ya que observamos una disminución en los niveles de JNK p54 total y fosforilado en los ratones del grupo experimental 1, mientras que observamos un aumento en la fosforilación de JNK p54 en el grupo experimental 2 en los ratones sometidos a un ambiente enriquecido. Por lo tanto se requieren más estudios para determinar el estado de activación de las vías inflamatorias en la periferia, ya sea mediante el uso de otros marcadores, o evaluando la activación de estas vías en otros tejidos (ej. en tejido adiposo).

Observamos un aumento en la activación de la vía de JNK en el hipotálamo de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, que concuerda con lo reportado en otros estudios (Belgardt *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2005). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no logramos observar un aumento en los niveles de fosforilación de IKK que había sido reportado previamente (Posey *et al.*, 2009), pero faltaría determinar si podemos observar la activación de esta vía por un aumento en la actividad de NF- κ B (De Souza *et al.*,

2005; Zhang *et al.*, 2008). Adicionalmente, el ambiente enriquecido disminuyó la activación de las vías inflamatorias de JNK e IKK en el como habíamos sugerido en nuestra hipótesis. Diferentes estudios han determinado que la inhibición de las vías de JNK e IKK en el hipotálamo llevan a una disminución en la ingesta y ganancia de peso, al igual que a un aumento en la sensibilidad a la insulina (Belgardt *et al.*, 2010; Benzler *et al.*, 2013; Posey *et al.*, 2009; Sabio *et al.*, 2010), lo que sustenta los efectos que estamos observando en los ratones sometidos a un ambiente enriquecido alimentados con una dieta alta en grasa. De forma interesante, observamos que los ratones alimentados con una dieta normal en un ambiente enriquecido presentan un aumento en la sensibilidad a la insulina y una menor activación de IKK y de JNK en el hipotálamo. Esto podría deberse a que durante el envejecimiento se ha observado un aumento en la activación de NF- κ B (Zhang *et al.*, 2013), lo que correlaciona con el desarrollo de una ligera resistencia a la insulina en los ratones C57BL/6 con la edad (Collins *et al.*, 2004).

Adicionalmente, nosotros observamos una disminución en los niveles de c-Fos en los hipotálamos de ratones alimentados con una dieta alta en grasa que es prevenida en los ratones sometidos a un ambiente enriquecido. Los niveles proteicos de c-Fos se han visto alterados en respuesta a la administración de una dieta alta en grasa, donde se observó una disminución en el hipotálamo ventromedial y un aumento en el hipotálamo lateral (Wang *et al.*, 1999) lo que es consistente con los efectos observados en la activación de las poblaciones neuronales orexigénicas y anorexigénicas durante la obesidad. Estos resultados sugieren una mayor actividad neuronal en el hipotálamo en respuesta a un ambiente enriquecido en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, y sería de interés determinar si este aumento en la actividad sucede en las regiones anorexigénicas del hipotálamo. Diferentes estudios han reportado un aumento en los ARN mensajeros de c-Fos en diferentes regiones del cerebro en respuesta a un ambiente enriquecido (Ali *et al.*, 2009; Bezard *et al.*, 2003; Reichmann *et al.*, 2013). En nuestras condiciones experimentales no observamos un aumento en los niveles de proteína de c-Fos en respuesta a un ambiente enriquecido en los ratones que fueron alimentados con una dieta normal, por lo que faltaría determinar si logramos ver una inducción a nivel de mensajero.

De igual manera, se ha reportado que el ambiente enriquecido induce un aumento en los niveles de BDNF en diferentes regiones del cerebro incluyendo el hipotálamo (Cao *et al.*, 2010, 2011; Ickes *et al.*, 2000; Kuzumaki *et al.*, 2011; Rampon *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001).

Consistente con esto, observamos un aumento en los niveles de BDNF maduro en respuesta a un ambiente enriquecido en el hipotálamo. Nosotros observamos que los niveles de proBDNF y de BDNF total se encuentran disminuidos en los ratones a los cuales se les administró una dieta alta en grasa, mientras que el ambiente enriquecido previene la disminución de los niveles de BDNF en el hipotálamo. Esto concuerda con diferentes estudios en murinos donde han observado que la deficiencia de BDNF en el hipotálamo genera hiperfagia, resistencia a la leptina y obesidad (Unger *et al.*, 2007), mientras que la administración exógena de BDNF en el hipotálamo disminuye la ingesta y los niveles de glucosa e insulina en sangre (Cao *et al.*, 2009; Godar *et al.*, 2011; Ono *et al.*, 1997). Estos resultados nos indican que la disminución en la ingesta observada en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa podría estar mediada por un aumento en los niveles de BDNF en el hipotálamo en respuesta a un ambiente enriquecido.

En conjunto estos resultados nos indican que el ambiente enriquecido es capaz de activar al hipotálamo y a su vez disminuir la inflamación en un estado de obesidad y de diabetes (**Figura 22**). Esto nos sugiere un mecanismo molecular que podría reestablecer la respuesta del hipotálamo a las señales energéticas del organismo para regular la ingesta, la ganancia de peso, y la sensibilidad a la insulina. Además, este estudio pone en evidencia que el ambiente enriquecido puede estimular núcleos específicos del hipotálamo dependiendo de las condiciones experimentales, ya que a pesar de que en nuestras condiciones observamos una mejoría en la sensibilidad a insulina y glucosa los ratones continuaron aumentando de peso. Estos datos sugieren que el control de la respuesta inflamatoria en un modelo de diabetes tipo II es primordial para el restablecimiento del metabolismo de la glucosa.

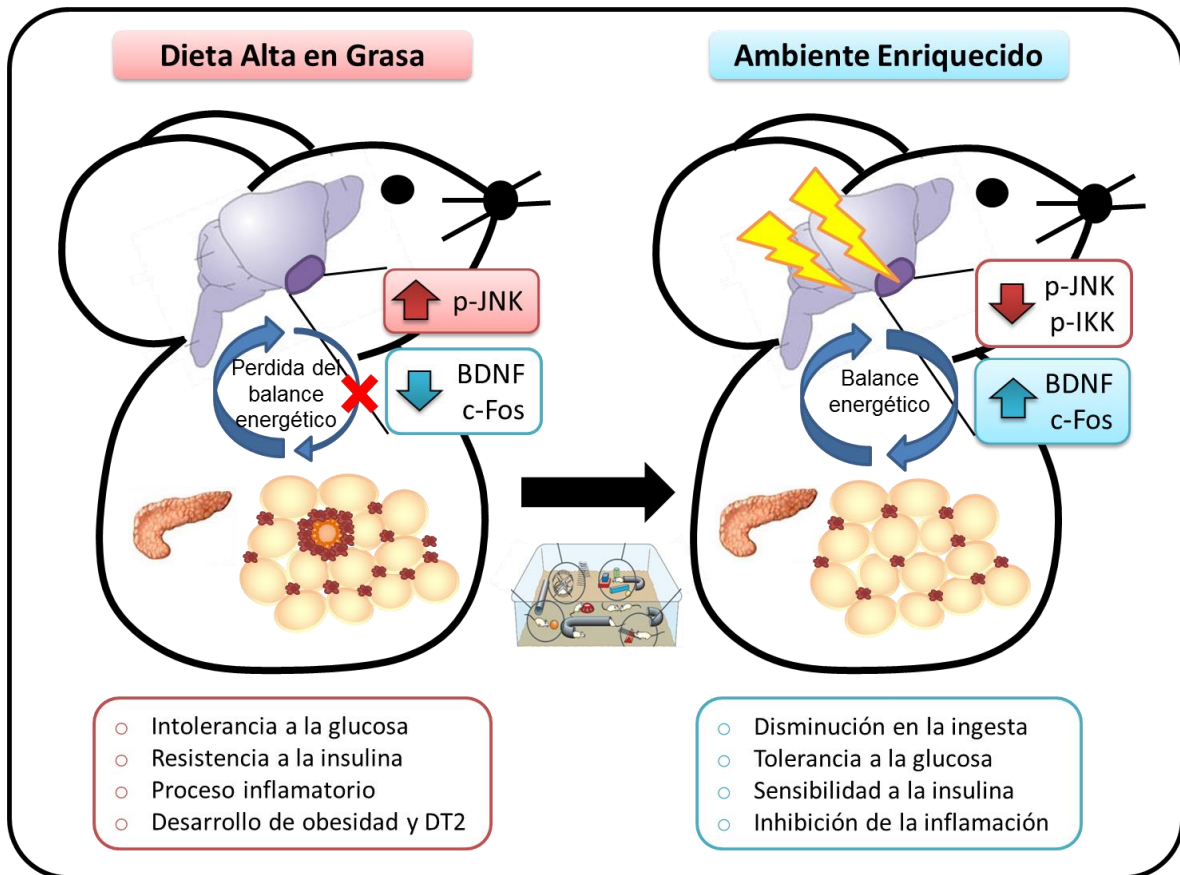


Figura 22 - Efecto del ambiente enriquecido en un modelo murino de obesidad y diabetes tipo II

La administración de una dieta alta en grasa lleva a un aumento en el peso corporal y al desarrollo de un proceso inflamatorio que genera intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Adicionalmente, en el hipotálamo se puede observar un aumento en la activación de JNK y una disminución en los niveles proteicos de BDNF y c-Fos. Nosotros observamos que la exposición a un ambiente enriquecido disminuye la ingesta y aumenta la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones obesos. De igual manera, el ambiente enriquecido disminuye la activación de JNK e IKK y aumenta los niveles de BDNF y c-Fos en el hipotálamo. Estos resultados nos sugieren un mecanismo molecular por el cual el ambiente enriquecido lleva a la activación del hipotálamo para reestablecer el balance energético.

CONCLUSIONES

- La administración de una dieta alta en grasa en ratones genera un aumento en el peso, altera la homeostasis de glucosa, y lleva al desarrollo de resistencia a la insulina.
- El ambiente enriquecido previene el desarrollo de resistencia a la insulina causado por la edad en ratones alimentados con una dieta normal
- El ambiente enriquecido mejora la homeostasis de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa
- La administración de una dieta alta en grasa genera un aumento en el tamaño de los adipocitos, además de una mayor infiltración de células y la presencia de estructuras tipo corona en el tejido adiposo.
- El ambiente enriquecido no impide el aumento en el tamaño de los adipocitos pero disminuye la presencia de estructuras de tipo corona
- En el hipotálamo, el ambiente enriquecido disminuye la activación de las vías de JNK e IKK causada por la administración de una dieta alta en grasa.
- El ambiente enriquecido previene la disminución de los niveles de c-Fos y BDNF en el hipotálamo causada por la administración de una dieta alta en grasa.

APENDICE I - FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Realizamos una prueba para determinar la respuesta a insulina en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa en un ambiente normal (DAG AN) o en un ambiente enriquecido (DAG AE). Se utilizó como control ratones inyectados con PBS para medir las variaciones en los niveles de glucosa en sangre causados por el estrés que conlleva la prueba. En respuesta a una inyección de insulina, los niveles de glucosa en sangre disminuyeron en el ratón control (Ctrl) alimentado con una dieta normal y en los ratones en una DAG AE (**Figura S1A**). Adicionalmente, observamos un aumento en los niveles de glucosa en sangre en los ratones inyectados con PBS al igual que en los ratones en una DAG AN inyectados con insulina. Al calcular el área bajo la curva no observamos diferencias entre los ratones en una DAG AN con los ratones inyectados con PBS, mientras que el área fue menor en el grupo DAG AE (**Figura S1B**). Estos resultados nos sugieren que la inyección de insulina en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa en un ambiente normal no tiene un efecto en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, indicativo de una resistencia a la insulina.

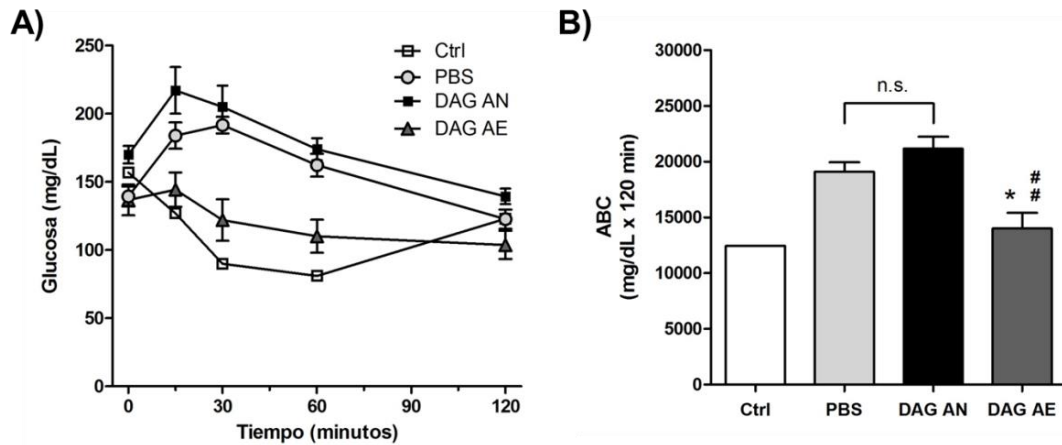


Figura S1 - Prueba de resistencia a la insulina (PRI) en ratones alimentados con una dieta alta en grasa

(A) PRI en ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta alta en grasa. La prueba se realizó 10 semanas después de ser separados a un ambiente normal (AN) y ambiente enriquecido (AE) (26 semanas totales). Se utilizó un ratón de 7 meses de la cepa BALB/c como control (Ctrl) de la respuesta a insulina (n=1). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1mU/gr de insulina (Ctrl, DAG AN y DAG AE) o una inyección intraperitoneal de PBS 1X en ratones DAG AE. **(B)** El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=3-5). * P<0.05, ** P<0.01 (* vs. PBS, # vs. DAG AN)

Al finalizar con las pruebas de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina decidimos hacer una comparación entre las pruebas realizadas antes y después del cambio al ambiente enriquecido. En la prueba de tolerancia a la glucosa no observamos diferencias en la respuesta en los ratones alimentados con una DN en los dos grupos experimentales (**Figura S2A-D**).

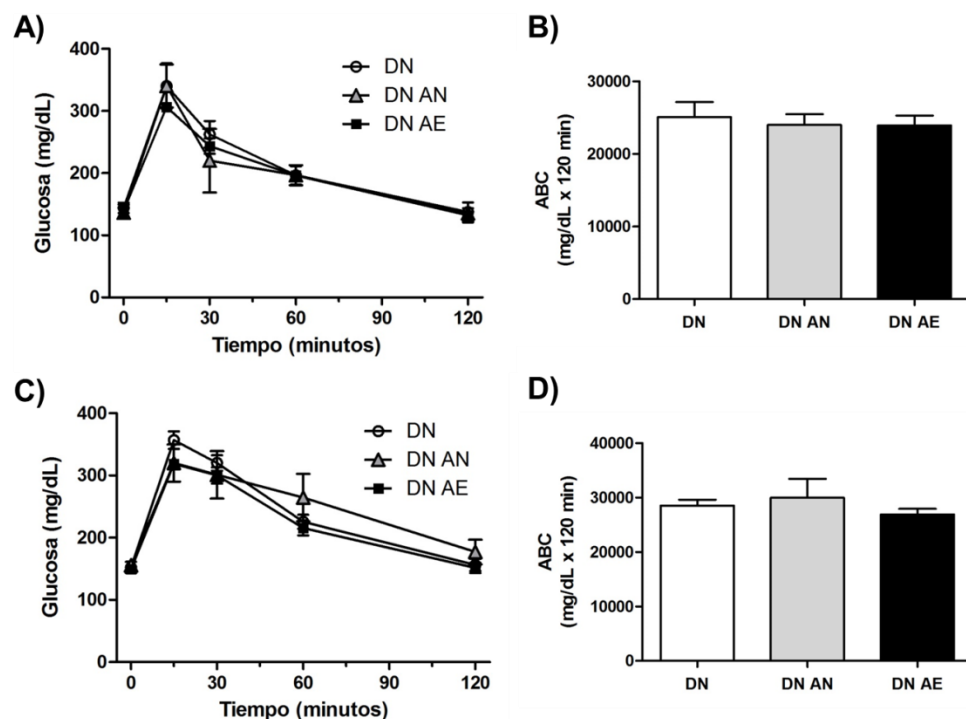


Figura S2 - Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) en animales alimentados con una dieta normal antes y después del cambio al ambiente enriquecido.

(A) Comparación de las PTG realizadas a los ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal, a las 15 semanas totales (DN) y a las 10 semanas (26 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DN AN) y un ambiente enriquecido (DN AE). **(C)** Comparación de las PTG realizadas a los ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta normal, a las 11 semanas totales (DN) y a las 9 semanas (22 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DN AN) y un ambiente enriquecido (DN AE). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1.8 mg/gr de glucosa. **(B y D)** El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 **(B)** y el grupo 2 **(D)** de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=5).

Sin embargo, podemos observar que en la prueba de resistencia a la insulina realizada después del cambio al ambiente enriquecido los ratones del grupo DN AN respondieron menos a una inyección de insulina, mientras que los ratones del grupo DN AE se comportaron de manera similar a la prueba realizada antes del cambio (DN) (**Figura S3A-D**). Estos resultados nos sugieren que el ambiente enriquecido previene el desarrollo de resistencia a la insulina debido a la edad en los ratones alimentados con una dieta normal.

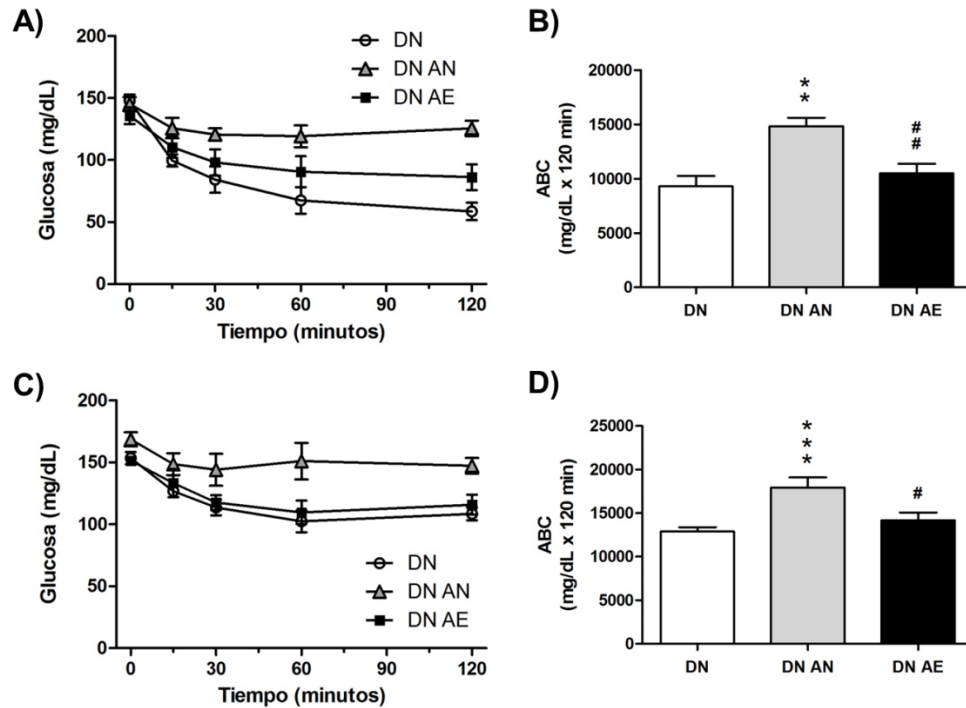


Figura S3 - Prueba de resistencia a la insulina (PRI) en animales alimentados con una dieta normal antes y después del cambio al ambiente enriquecido.

(A) Comparación de las PRI realizadas a los ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta normal, a las 15 semanas totales (DN) y a las 10 semanas (26 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DN AN) y un ambiente enriquecido (DN AE). **(C)** Comparación de las PRI realizadas a los ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta normal, a las 11 semanas totales (DN) y a las 12 semanas (25 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DN AN) y un ambiente enriquecido (DN AE). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1mU/gr de insulina. **(B y D)** El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 **(B)** y el grupo 2 **(D)** de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=5). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (* vs. DN, # vs. DN AN)

En cuanto a la prueba de tolerancia a la glucosa realizada en los ratones alimentados con una DAG del experimento 1, observamos que los ratones del grupo DAG AE respondieron igual a los ratones antes de la división en diferentes ambientes, mientras que los ratones del grupo DAG AN presentaron intolerancia a la glucosa (**Figura S4A-D**).

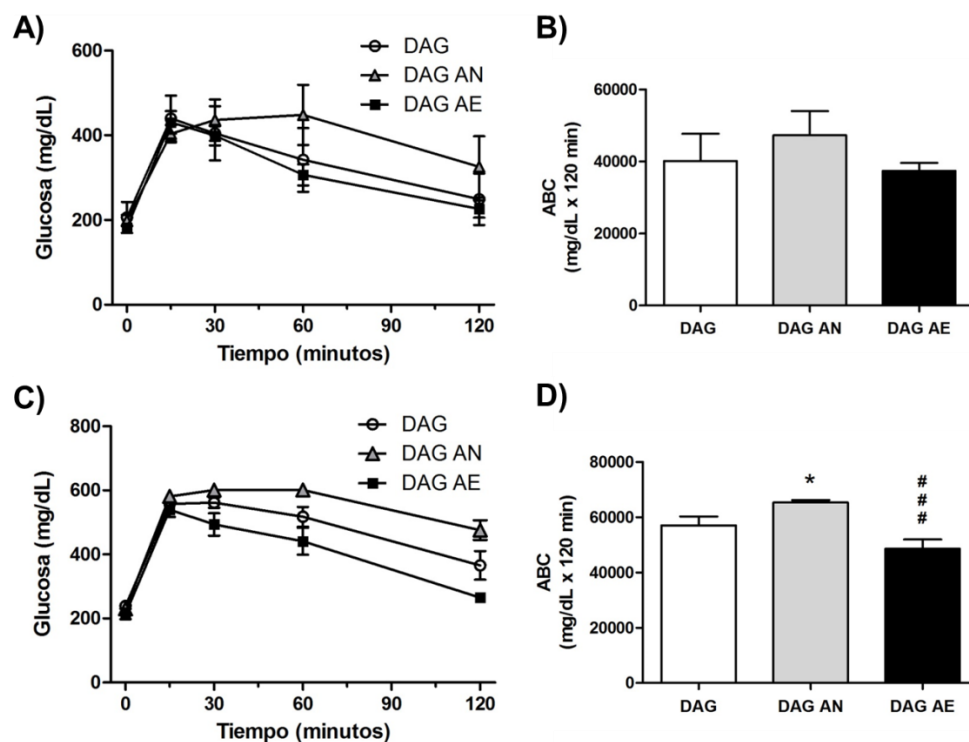


Figura S4 - Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) en animales alimentados con una dieta alta en grasa antes y después del cambio al ambiente enriquecido.

(A) Comparación de las PTG realizadas a los ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta alta en grasa, a las 15 semanas totales (DAG) y a las 10 semanas (26 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DAG AN) y un ambiente enriquecido (DAG AE). **(C)** Comparación de las PTG realizadas a los ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta normal, a las 11 semanas totales (DAG) y a las 9 semanas (22 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DAG AN) y un ambiente enriquecido (DAG AE). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1.8 mg/gr de glucosa. **(B y D)** El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 **(B)** y el grupo 2 **(D)** de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=5). * P<0.05, *** P<0.001 (* vs. DAG, # vs. DAG AN)

De igual manera, en la prueba de resistencia a la insulina en los ratones del grupo experimental 1 observamos que los ratones del grupo DAG AN generaron resistencia a la insulina mientras que los del grupo DAG AE todavía respondieron a la inyección de insulina, de forma similar a la respuesta observada antes de la división en ambientes (**Figura S5A-D**). En el grupo experimental 2, podemos observar que los ratones ya presentaban resistencia a la insulina previo a la división en ambientes, mientras que el ambiente enriquecido aumentó la sensibilidad a la insulina. Estos resultados nos indican que el ambiente enriquecido mejora la homeostasis de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina de ratones que fueron alimentados con una dieta alta en grasa.

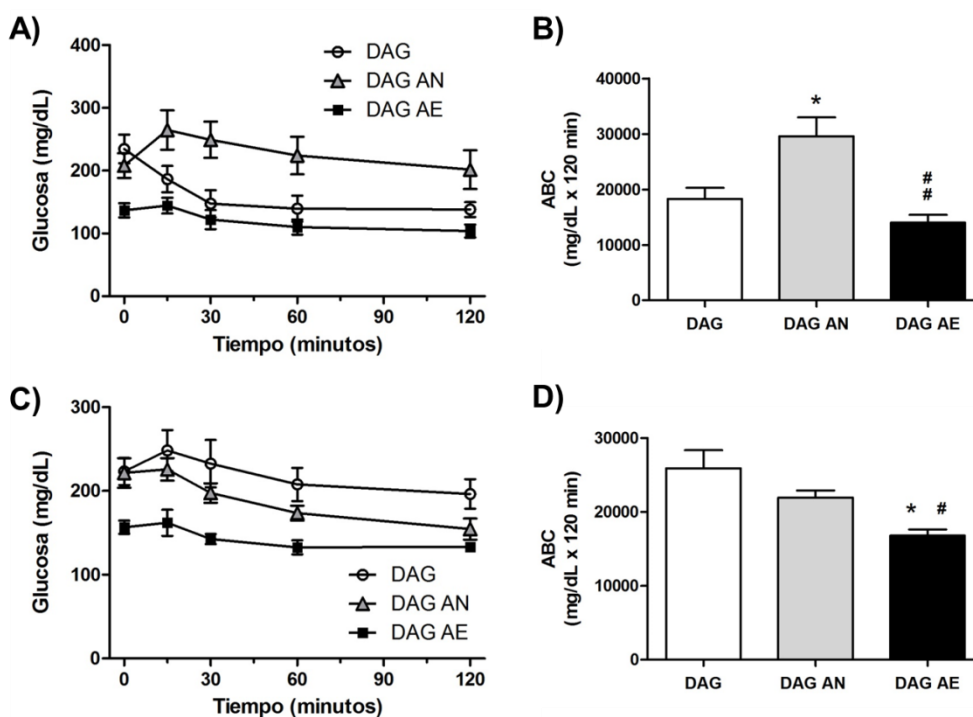


Figura S5 - Prueba de resistencia a la insulina (PRI) en animales alimentados con una dieta alta en grasa antes y después del cambio al ambiente enriquecido.

(A) Comparación de las PRI realizadas a los ratones del grupo experimental 1 alimentados con una dieta alta en grasa, a las 15 semanas totales (DAG) y a las 10 semanas (26 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DAG AN) y un ambiente enriquecido (DAG AE). **(C)** Comparación de las PRI realizadas a los ratones del grupo experimental 2 alimentados con una dieta alta en grasa, a las 11 semanas totales (DAG) y a las 12 semanas (25 semanas totales) de ser divididos en un ambiente normal (DAG AN) y un ambiente enriquecido (DAG AE). Las gráficas representan la concentración de glucosa en sangre posterior a una inyección intraperitoneal de 1mU/gr de insulina. **(B y D)** El área bajo la curva (ABC) utilizando la fórmula de Tai para el grupo 1 **(B)** y el grupo 2 **(D)** de las curvas de glucosa. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar (n=5). * P<0.05, ** P<0.01 (* vs. DAG, # vs. DAG AN)

APENDICE II – *BUFFERS* Y SOLUCIONES

TRITON LYSIS BUFFER (TLB)

Ingrediente	Stock	50 ml	100 ml
20mM Tris pH 7.4	1M	1 ml	2 ml
137mM NaCl	X	0.4 gr	0.8 gr
25mM β-glicerofosfato	X	0.27 gr	0.54 gr
2mM PPIa	X	0.0446 gr	0.089
2mM EDTA pH 7.4	0.5M	0.2 ml	0.4 ml
1% Triton X-100	100%	0.5 ml	1 ml
10% Glicerol	100%	5 ml	10 ml
H₂O		Aforar a 50 ml	Aforar a 100 ml

Filtrar en campana y guardar a 4°C

Tris 1M pH 7.4		EDTA 0.5M pH 7.4	
Tris	121.14 gr	EDTA	376 gr
H ₂ O	1 L	H ₂ O	1 L
Ajustar pH con HCl		Ajustar pH con NaOH	

TLB SUPLEMENTADO CON INHIBIDORES ENZIMATICOS

Inhibidor	Stock	1 ml
1 mM PMSF	100 mM	10 µl
5 µg/ml Leupeptina	2.5 mg/ml	2 µl
5 µg/ml Pepstatina	2.5 mg/ml	2 µl
5 µg/ml Antipaína	2.5 mg/ml	2 µl
5 µg/ml Aprotinina	2.5 mg/ml	2 µl
1 mM Na₃VO₄	100 mM	10 µl
0.5 mM DTT	0.5 M	1 µl
H₂O		971 µl

* Preparar al momento

SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

4X Lower gel buffer		4X Upper gel buffer		Acrilamida 30%	
Tris-base	18.17 gr	Tris-base	6.06 gr	Acrilamida	58.35 gr
SDS	0.4 gr	SDS	0.4 gr	Bisacrilamida	1.65 gr
Ajustar pH a 8.8 con HCl		Ajustar pH a 6.8 con HCl		Aforar a 200 ml con H ₂ O	
Aforar a 100 ml con H ₂ O		Aforar a 100 ml con H ₂ O		Filtrar y almacenar a 4°C	

Resolving (Lower) gel	10%	12%	Stacking (Upper) gel	
H ₂ O	3.9 ml	3.25 ml	H ₂ O	2.9 ml
4x Lower gel buffer	2.5 ml	2.5 ml	4x Upper gel buffer	1.25 ml
Acrilamida 30%	3.35 ml	4 ml	Acrilamida 30%	0.7 ml
APS 10%	50 µl	50 µl	APS 10%	12.5 µl
TEMED	7 µl	7 µl	TEMED	7 µl
	10 ml	10ml		5 ml

Buffer de Corrida 10X

Glicina	144 gr
Tris	30 gr
SDS	10 gr

Aforar a 1 L con H₂O
*Usar 1X

Buffer de Transferencia 10X

Glicina	144 gr
Tris	30 gr

Aforar a 1 L con H₂O

Para usar 1X agregar 200 ml de metanol

*Guardar a 4°C

4X Tris/SDS pH 6.8

Tris-base	6.05 gr
SDS	0.4 gr

Aforar a 100 mL con H₂O

Ajustar pH con HCl

Filtrar y almacenar a 4°C

Buffer de carga con SDS

4X Tris/SDS pH 6.8	7 ml
Glicerol	3 ml

SDS
 1 gr |

β-mercaptoetanol
 1.2 ml |

Azul de bromofenol
 ≥ 10 mg |

Aforar a 1 ml con H₂O

*almacenar a -20°C

10X TBS

Tris-base	24.22 gr
-----------	----------

NaCl	87.66 gr
------	----------

Aforar a 1L con H₂O

Ajustar pH a 7.4

TBS-T (0.1%) Tween

10X TBS	50 ml
---------	-------

H ₂ O	450 ml
------------------	--------

Tween 20	500 µl
----------	--------

Ajustar pH con NaOH

Solución desnudante

Glicina (0.2M)	7.5 gr
----------------	--------

NaCl (0.5M)	14.61 gr
-------------	----------

Aforar a 500 ml con H₂O

Ajustar pH a 2.5 con HCl

* Guardar a 4°C

TBS-T 0.1% Alta Sal

10X TBS	50 ml
---------	-------

NaCl	13.5 gr
------	---------

Tween 20	500 µl
----------	--------

Aforar a 500 ml con H₂O

APENDICE III – PROTOCOLOS

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y DE RESISTENCIA A LA INSULINA

MATERIAL

- Lámpara
- Glucosa (180 mg/ml)
- Gasas
- Jaula Limpia
- Insulina (0.1 U/ml)
- Plumón indeleble
- Bisturí / Tijeras
- Jeringas numeradas
- Timer
- Glucómetro
- Tiras reactivas (5 por ratón)
- Adaptador de plástico

1. Poner a los ratones en ayuno 4 o 6 horas antes de realizar la prueba
2. Dependiendo de la prueba a realizar preparar:
 - A. Prueba de tolerancia a la glucosa: Glucosa 180 mg/ml en PBS 1x estéril
 - B. Prueba de resistencia a la insulina: Insulina 0.1 U/ml en PBS 1X estéril a partir de diluciones seriales (100 U/ml -> 10 U/ml -> 1U/ml -> 0.1 U/ml)
3. Colocar a los ratones debajo de la lámpara 10 minutos antes del experimento para favorecer la vasodilatación
4. Marcar a los ratones con plumón indeleble para diferenciarlos
5. Registrar el peso de cada ratón
6. Marcar las jeringas en baso al número de los ratones
7. Cargar 10 μ l de solución por gramos de peso de cada ratón (1.8 mg de glucosa o 1 mU de insulina por gramo).
8. Programar el Timer a 120 minutos
9. Cortar la punta de la cola del ratón con un bisturí o tijeras, ayudarse del adaptador de plástico
10. Obtener una gota de sangre y colocarla en la tira reactiva
11. Registrar los valores de glucosa en sangre en cada intervalo de tiempo (15, 30, 60 y 120 minutos)

WESTERN BLOT.

Preparación de las muestras:

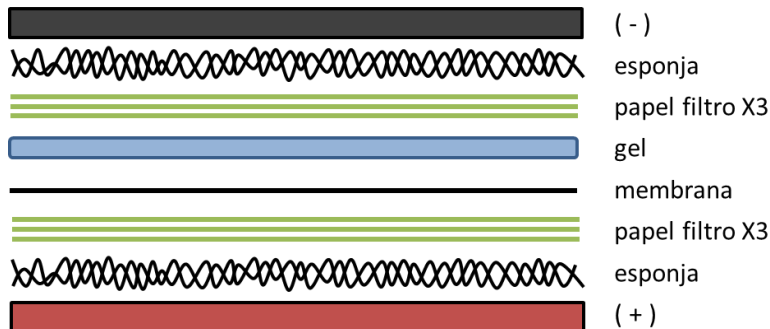
- Tomar el volumen necesario para tener 30µg de proteína (dependiendo de la concentración de cada muestra)
- Agregar 5 µl de *buffer* de carga 6X
- Llevar a un volumen de 30 µl con H₂O miliQ estéril
- Hervir las muestras por 5 minutos
- Guardar a -20°C si no se van a utilizar en el momento.

Preparación del gel de acrilamida:

- Limpiar los vidrios con separadores y peines a emplear (Separadores de 1.5 mm y peines de 15 pozos)
- Ensamblar los vidrios en el molde. Verter agua con una piseta para verificar que los vidrios estén correctamente ensamblados. Retirar el agua y secar con papel filtro.
- Introducir el peine dentro de los vidrios y hacer una marca 1 cm debajo del final del peine
- Preparar 10 ml de Resolving (Lower) gel por cada gel que se vaya a hacer de acuerdo al porcentaje que se vaya a utilizar (ver apéndice II)
- Verter la mezcla dentro de los vidrios hasta la marca asegurándose de no formar burbujas. Colocar unas gotas de etanol con una piseta y dejar polimerizar
- Preparar 5 ml de Stacking (Upper) gel por cada gel que se vaya a hacer (ver apéndice II)
- Verter la mezcla dentro de los vidrios hasta llenarlos.
- Introducir inmediatamente el peine y dejar polimerizar

Corrida del gel y transferencia:

- Retirar el peine con cuidado
- Lavar los pozos utilizando una piseta de agua destilada
- Montar el gel en la cámara, utilizando el *buffer dam* si no son número par, y llenar el tanque de *buffer* de corrida 1X hasta donde se indique dependiendo del número de geles a correr
- Cargar las muestras y 5 µl de marcador de peso molecular en el gel.
- Agregar 5 µl de *buffer* de carga 6X a los pozos que no tengan muestra
- Correr a 30mA por gel hasta que se obtenga la separación deseada ente los marcadores
- Detener la corrida y desensamblar los vidrios con cuidado para sacar el gel, no dejarlo secar
- Armar el “sándwich” para la transferencia en una charola con *buffer* de transferencia 1X como se muestra en el diagrama, asegurándose que no queden burbujas entre la membrana y el gel. El gel debe quedar del lado negativo y la membrana del lado positivo.



- Cerrar el sándwich presionando para sacar las burbujas que hayan quedado atrapadas.
- Poner el sándwich en la cámara de transferencia y llenar de *buffer* de transferencia 1X hasta donde indica la marca.
- Transferir a 100 volts por 90 o 120 minutos.
- Colocar gel refrigerante o correr la transferencia en el cuarto frío
- Terminada la transferencia, desarmar el sándwich para sacar la membrana.
- Teñir la membrana con rojo de Ponceau por 5 minutos y lavar con agua destilada para quitar el exceso de colorante. Colocar la membrana en un protector para poderla escanear
- Cortar la membrana dependiendo del tamaño de las proteínas que se quiere observar utilizando un bisturí
- Si no se va a continuar, guardar la membrana seca a temperatura ambiente en el protector

Incubación de anticuerpos:

- Bloquear la membrana en leche al 5% en TBS-T 0.1% durante 1-2 horas a temperatura ambiente en agitación
- Enjuagar membrana en TBS 1X, si no se va a continuar guardar en TBS 1X a 4°C
- Colocar el anticuerpo primario diluido en leche o BSA al 5% en TBS-T 0.1% según indicado. Incubar la membrana durante 4 horas o toda la noche (dependiendo del anticuerpo) a 4°C en agitación
- Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0.1%
- Colocar el anticuerpo secundario correspondiente diluido en leche o BSA al 5%. Incubar la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación
- Revelar

Stripping de membranas:

- Después de revelar hacer stripping de las membranas en las que se vaya a ver más de una proteína (ej. proteína fosforilada y luego total)
- Lavar 20 minutos con Solución desnudante
- Lavar 10 minutos con TBS-T alta sal
- Lavar 10 minutos con TBS-T 0.1%
- Incubar anticuerpo primario

REFERENCIAS

Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., and White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 1531–1537.

Ahima, R.S., and Osei, S.Y. (2004). Leptin signaling. *Physiology & Behavior* 81, 223–241.

Ahren, B., Mansson, S., Gingerich, R.L., Havel, P.J., N, B.O.A., Mansson, S., Gingerich, R.L., Hawl, P.J., Mfmsson, S., and Gingerich, L. (2012). Regulation of plasma leptin in mice : influence of age , high-fat diet , and fasting Regulation of plasma leptin in mice : influence of age , high-fat diet , and fasting.

Ali, A.E. a, Wilson, Y.M., and Murphy, M. (2009). A single exposure to an enriched environment stimulates the activation of discrete neuronal populations in the brain of the fos-tau-lacZ mouse. *Neurobiology of Learning and Memory* 92, 381–390.

Andrikopoulos, S., Blair, A.R., Deluca, N., Fam, B.C., and Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295, E1323–32.

Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 11, 191–198.

Arranz, L., De Castro, N.M., Baeza, I., Maté, I., Viveros, M.P., and De la Fuente, M. (2010). Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Research* 13, 415–428.

Bakos, J., Hlavacova, N., Rajman, M., Ondicova, K., Koros, C., Kitraki, E., Steinbusch, H.W.M., and Jezova, D. (2009). Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience* 164, 788–797.

Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R. a, Chua, S.C., Elmquist, J.K., et al. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42, 983–991.

Bao, a-M., Meynen, G., and Swaab, D.F. (2008). The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Research Reviews* 57, 531–553.

Bashan, N., Dorfman, K., Tarnovscki, T., Harman-Boehm, I., Liberty, I.F., Blüher, M., Ovadia, S., Maymon-Zilberstein, T., Potashnik, R., Stumvoll, M., et al. (2007). Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology* 148, 2955–2962.

Baskin, D.G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., and Schwartz, M.W. (1999). Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Research* 848, 114–123.

Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., and Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network* 17, 4–12.

Belgardt, B.F., Okamura, T., and Br, J.C. (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. 22, 5305–5314.

Belgardt, B.F., Mauer, J., Wunderlich, F.T., Ernst, M.B., Pal, M., Spohn, G., Brönneke, H.S., Brodesser, S., Hampel, B., Schauss, A.C., et al. (2010). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 6028–6033.

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, a, Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, a, Yaniv, I., and Pick, C.G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *The European Journal of Neuroscience* 20, 1341–1347.

Benzler, J., Ganjam, G.K., Legler, K., Stöhrz, S., Krüger, M., Steger, J., and Tups, A. (2013). Acute inhibition of central c-Jun N-terminal kinase restores hypothalamic insulin signalling and alleviates glucose intolerance in diabetic mice. *Journal of Neuroendocrinology*.

Berglund, E.D., Vianna, C.R., Jr, J.D., Kim, M.H., Chuang, J., Lee, C.E., Lauzon, D.A., Lin, P., Brule, L.J., Scott, M.M., et al. (2012). Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. 122.

Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-lewis, V., Przedborski, S., Piazza, P.V., Gross, C.E., Jaber, M., and Segalen, V. (2003). Enriched Environment Confers Resistance to 1-Methyl-4- Involvement of Dopamine Transporter and Trophic Factors. 23, 10999–11007.

Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., and Flier, J.S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* 1, 619–625.

Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N., and Morrison, C.D. (2009). Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1792, 395–400.

Cai, D. (2009). NFkappaB-mediated metabolic inflammation in peripheral tissues versus central nervous system. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 2542–2548.

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P. a, Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature Medicine* 11, 183–190.

Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.-L., et al. (2005). Reduction of macrophage infiltration and

chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54, 2277–2286.

Cao, L., Lin, E.-J.D., Cahill, M.C., Wang, C., Liu, X., and During, M.J. (2009). Molecular therapy of obesity and diabetes by a physiological autoregulatory approach. *Nature Medicine* 15, 447–454.

Cao, L., Liu, X., Lin, E.-J.D., Wang, C., Choi, E.Y., Riban, V., Lin, B., and During, M.J. (2010). Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell* 142, 52–64.

Cao, L., Choi, E.Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., and During, M.J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metabolism* 14, 324–338.

Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., and Considine, R. V (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159–161.

Carvalho, J.B., Siloto, R.M., Ignacchitti, I., Brenelli, S.L., Carvalho, C.R., Leite, a, Velloso, L. a, Gontijo, J. a, and Saad, M.J. (2001). Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Letters* 500, 119–124.

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* 46, 2347–2355.

Collins, S., Martin, T.L., Surwit, R.S., and Robidoux, J. (2004). Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior* 81, 243–248.

Cowley, M. a, Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484.

Cunha, C., Brambilla, R., and Thomas, K.L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience* 3, 1.

Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology* 11, 98–107.

Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1999). and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. 23, 775–786.

Folli, F., Ghidella, S., Bonfanti, L., Kahn, C.R., and Merighi, a (1996). The early intracellular signaling pathway for the insulin/insulin-like growth factor receptor family in the mammalian central nervous system. *Molecular Neurobiology* 13, 155–183.

Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M.J., and Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 48115–48121.

García Soidán, F.J. (2009). Diabetología Seminarios de diabetes Principales diferencias entre glucemia basal alterada e intolerancia a la glucosa. *Avances En Diabetología* 25, 105–109.

Glaser, R., and Kiecolt-glaser, J.K. (2005). implications for health. 5.

Godar, R., Dai, Y., Bainter, H., Billington, C., Kotz, C.M., and Wang, C.F. (2011). Reduction of high-fat diet-induced obesity after chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic ventromedial nucleus. *Neuroscience* 194, 36–52.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology* 29, 415–445.

Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., et al. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature Neuroscience* 8, 1289–1291.

Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Rapid Publication Obesity and Insulin Resistance. 95, 2409–2415.

Hummasti, S., and Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circulation Research* 107, 579–591.

Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L. a, Albeck, D.S., Mohammed, a H., and Granholm, a C. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology* 164, 45–52.

Ji, Y., Sun, S., Xu, A., Bhargava, P., Yang, L., Lam, K.S.L., Gao, B., Lee, C.-H., Kersten, S., and Qi, L. (2012). Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 13561–13571.

Joly-Amado, A., Denis, R.G.P., Castel, J., Lacombe, A., Cansell, C., Rouch, C., Kassis, N., Dairou, J., Cani, P.D., Ventura-Clapier, R., et al. (2012). Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *The EMBO Journal* 31, 4276–4288.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. 116.

Kim, J.K., Fillmore, J.J., Sunshine, M.J., Albrecht, B., Higashimori, T., Kim, D., Liu, Z., Soos, T.J., Cline, G.W., Brien, W.R.O., et al. (2004). PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *114*, 823–827.

Kim, M.-S., Pak, Y.K., Jang, P.-G., Namkoong, C., Choi, Y.-S., Won, J.-C., Kim, K.-S., Kim, S.-W., Kim, H.-S., Park, J.-Y., et al. (2006). Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nature Neuroscience* 9, 901–906.

Kitamura, T., Feng, Y., Kitamura, Y.I., Chua, S.C., Xu, A.W., Barsh, G.S., Rossetti, L., and Accili, D. (2006). Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nature Medicine* 12, 534–540.

Kohno, D., and Yada, T. (2012). Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides* 46, 315–319.

Könner, a C., and Brüning, J.C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 22, 16–23.

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., Hareyama, N., Imai, S., Narita, M., Torigoe, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., et al. (2011). Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus* 21, 127–132.

Laviola, G., Rea, M., Morley-Fletcher, S., Di Carlo, S., Bacosi, A., De Simone, R., Bertini, M., and Pacifici, R. (2004). Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *The European Journal of Neuroscience* 20, 1655–1664.

Laviola, G., Hannan, A.J., Macrì, S., Solinas, M., and Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease* 31, 159–168.

Lechan, R.M., and Fekete, C. (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research* 153, 209–235.

Leininger, G.M. (2011). Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. *Physiology & Behavior* 104, 572–581.

Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *117*.

Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O’Shea, D., O’Farrelly, C., and Exley, M. a (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574–587.

Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E., and Sachser, N. (2003). Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior* 43, 281–292.

Marino, J.S., Xu, Y., and Hill, J.W. (2011). Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 22, 275–285.

Marques-Deak, a, Cizza, G., and Sternberg, E. (2005). Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Molecular Psychiatry* 10, 239–250.

Mehran, A.E., Templeman, N.M., Brigidi, G.S., Lim, G.E., Chu, K.-Y., Hu, X., Botezelli, J.D., Asadi, A., Hoffman, B.G., Kieffer, T.J., et al. (2012). Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metabolism* 16, 723–737.

Meng, Q., and Cai, D. (2011). Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 32324–32332.

Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, 359–370.

Mlynarik, M., Johansson, B.B., and Jezova, D. (2004). Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018, 273–280.

Morrison, C.D., Morton, G.J., Niswender, K.D., Gelling, R.W., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289, E1051–7.

Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2011). Leptin and the Central Nervous System Control of Glucose Metabolism. 389–411.

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.

Münzberg, H., Flier, J.S., and Bjørbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145, 4880–4889.

Nguyen, D.M., and El-Serag, H.B. (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterology Clinics of North America* 39, 1–7.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 15, 914–920.

Nithianantharajah, J., and Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience* 7, 697–709.

Odegaard, J.I., and Chawla, A. (2013). Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* 339, 172–177.

Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C.R., Goforth, M.H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A.W., and Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metabolism* 7, 496–507.

Ono, M., Ichihara, J., Nonomura, T., Itakura, Y., Taiji, M., Nakayama, C., and Noguchi, H. (1997). Brain-derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238, 633–637.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews. Immunology* 11, 85–97.

Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G., and Ozcan, U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metabolism* 9, 35–51.

Parekh, P.I., Petro, a E., Tiller, J.M., Feinglos, M.N., and Surwit, R.S. (1998). Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism: Clinical and Experimental* 47, 1089–1096.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 140, 197–208.

Posey, K. a, Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., et al. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296, E1003–12.

Praag, H. Van, Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *1*, 1–8.

Purkayastha, S., Zhang, G., and Cai, D. (2011). Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine* 17, 883–887.

Rampon, C., Jiang, C.H., Dong, H., Tang, Y., Lockhart, D.J., Schultz, P.G., Tsien, J.Z., and Hu, Y. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *97*.

Reichmann, F., Painsipp, E., and Holzer, P. (2013). Environmental Enrichment and Gut Inflammation Modify Stress-Induced c-Fos Expression in the Mouse Corticolimbic System. *PloS One* 8, e54811.

Remmers, F., and Delemarre-van de Waal, H. a (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocrine Reviews* 32, 272–311.

Reynolds, S., Lane, S.J., and Richards, L. (2010). Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. 120–132.

Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Prada, P., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Moraes, J.C., Frederico, M.J.S., Da Luz, G., Pinho, R. a, Carnevalheira, J.B.C., et al. (2009). Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *The Journal of Physiology* 587, 2341–2351.

Rydén, L., and Mellbin, L. (2012). Glucose perturbations and cardiovascular risk: challenges and opportunities. *Diabetes & Vascular Disease Research : Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* 9, 170–176.

Sabio, G., and Davis, R.J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 490–496.

Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D.Y., Ko, H.J., Ong, H., Morel, C., Mora, A., Reilly, J., Kim, J.K., et al. (2010). Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes & Development* 24, 256–264.

Saito, Y. (2008). The Melanin-Concentrating Hormone System and Its Physiological Functions.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. 414, 799–806.

Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M., Tsuji, T., Imagawa, K., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., and Nakao, K. (1997). The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neuroscience Letters* 224, 149–152.

Schmitz-Peiffer, C., and Biden, T.J. (2008). Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes* 57, 1774–1783.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Jr, D.P., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). control of food intake. 661–671.

Shaw, L.M. (2011). The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle* 10, 1750–1756.

Sherwin, R., and Jastreboff, a M. (2012). Year in diabetes 2012: The diabetes tsunami. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97, 4293–4301.

De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J. a, and Velloso, L. a (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192–4199.

Straub, R.H., Cutolo, M., Buttgerit, F., and Pongratz, G. (2010). Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *Journal of Internal Medicine* 267, 543–560.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., Defuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *56*.

Sweeney, G. (2002). Leptin signalling. *Cellular Signalling* *14*, 655–663.

Tabák, A.G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E.J., and Kivimäki, M. (2012). Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet* *379*, 2279–2290.

Tai, M.M. (1994). A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* *17*, 152–154.

Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *7*, 85–96.

Thaler, J.P., and Schwartz, M.W. (2010). Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* *151*, 4109–4115.

Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2006). Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 10741–10746.

Unger, T.J., Calderon, G. a, Bradley, L.C., Sena-Esteves, M., and Rios, M. (2007). Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* *27*, 14265–14274.

Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine* *17*, 179–188.

Villalpando, S., Shamah-Levy, T., Rojas, R., and Aguilar-Salinas, C. a (2010). Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. *Salud Pública De México* *52 Suppl 1*, S72–9.

Wang, H., Storlien, L.H., and Huang, X.F. (1999). Influence of dietary fats on c-Fos-like immunoreactivity in mouse hypothalamus. *Brain Research* *843*, 184–192.

Weisberg, S.P., Mccann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation. *112*.

Williamson, L.L., Chao, A., and Bilbo, S.D. (2012). Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity* *26*, 500–510.

Xu, A.W., Ste-Marie, L., Kaelin, C.B., and Barsh, G.S. (2007). Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes

decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology* 148, 72–80.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *112*, 1821–1830.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science (New York, N.Y.)* 293, 1673–1677.

Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Györi, G., Zlabinger, G.J., and Stulnig, T.M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *International Journal of Obesity* (2005) 31, 1420–1428.

Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G., and Cai, D. (2013). Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature* 497, 211–216.

Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61–73.

Zhao, L.R., Risedal, a, Wojcik, a, Hejzlar, J., Johansson, B.B., and Kokaia, Z. (2001). Enriched environment influences brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal stroke. *Neuroscience Letters* 305, 169–172.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *9*, 268–275.