



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y
EN LA PERIFERIA PARA LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO EN UN
MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. María del Sol Díaz de León Guerrero

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Leonor Pérez Martínez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Iván Velasco Velázquez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2022



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.

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 (IN213119 and IN213316), CONACYT (IFC 2016-2282 y 155290) y beca CONACYT de doctorado (384817).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda mi familia por su cariño y por todos los buenos momentos que hemos pasado en estos últimos años, a mi abuelita Matilde, a todos mis tíos y primos. Gracias también a René y a Ivonne por su apoyo y por todas las buenas conversaciones que hemos tenido.

Gracias a los amigos que estuvieron ahí durante el camino y que lo hicieron un poco más divertido. Agradezco a Edgardo, Inci, Bolivar, Oswaldo, Roli, Tomás, y Nohemí por su amistad y por siempre estar ahí en los buenos y los malos momentos para dar su apoyo. A Ángel, Cesar, Jess, y Chuy por todo el tiempo que pasamos entre juegos y risas. También agradezco a mis amigas de toda la vida Majo, Daniela, Bere y Fer por seguir siendo parte importante de mi vida y por su amistad.

También le agradezco a Alex por todo su apoyo y por siempre darme ánimos, además de evitar que me volviera loca durante la pandemia. Gracias por estar aquí, te quiero.

Finalmente, dedico esta tesis a mis padres. Gracias por todo su cariño, apoyo incondicional y por siempre empujarme a seguir adelante. Sin ustedes no estaría completando este logro. Gracias

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Leonor Pérez por permitirme ser parte de su laboratorio, por su mentoría y apoyo a lo largo de todo el doctorado. También quisiera agradecer al Dr. Gustavo Pedraza, a la Dra. Marcia Hiriart y al Dr. Iván Velasco por todas sus aportaciones y comentarios durante la realización del proyecto.

Agradezco a la Dra. Karla Meza, al Dr. David Valle, al Dr. Jonathan Salazar y a la Dra. Diana Aguilar por sus contribuciones al proyecto.

Agradezco a Oswaldo López y al Dr. Tomas Villaseñor Toledo por el apoyo técnico brindado para este proyecto.

Agradezco a la M.V.z. Elizabeth Mata, a la M.V.z Graciela Cabeza y al personal de la Unidad de Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM, por su apoyo con el manejo de los animales.

Agradezco a la M.C. Verónica Jiménez, a la Dra. Leticia Vega, al Dr. Ricardo Grande y al Dr. Alejandro Sánchez de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología, UNAM, por su apoyo en la secuenciación y en el análisis de la secuenciación de RNAs pequeños.

Agradezco a la Q.F.B. Xochitl Alvarado del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada, UNAM, por su ayuda en la adquisición de imágenes.

Agradezco a Sandra Rodríguez de la unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su ayuda con el procesamiento de tejido.

Agradezco a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología por su apoyo con todos los oligos y secuencias que fueron utilizados para este proyecto.

Agradezco al Lic. Antonio Bolaños y a Gloria Villa de la unidad de docencia por toda su ayuda durante el doctorado, también al L.I. Omar Arriaga de la Unidad de Biblioteca por su apoyo técnico durante mi doctorado.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para asistir a congresos durante el doctorado.

Finalmente agradezco a los miembros del laboratorio de Neuroinmunobiología por su ayuda y apoyo durante este periodo.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Regulación del balance energético en el hipotálamo.....	9
Obesidad e Inflamación.....	11
La obesidad genera inflamación en el sistema nervioso central.....	12
La inhibición de la inflamación disminuye las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.....	13
Antecedentes.....	15
El ambiente enriquecido regula al sistema nervioso y al sistema inmune.....	15
microRNAs como agentes reguladores de la obesidad.....	16
Justificación.....	19
Hipótesis y objetivos.....	20
Materiales y métodos.....	21
Ratones, dietas y condiciones habitacionales.....	21
Pruebas de tolerancia y resistencia a insulina.....	22
Extracción de proteína.....	23
Western blot.....	23
Arreglo de citocinas y quimiocinas.....	24
Ensayos de ELISA.....	24
Histología.....	24
Extracción de RNA, transcripción reversa y PCR tiempo real.....	25
Preparación de bibliotecas y secuenciación.....	27
Procesamiento de las secuencias, análisis de expresión diferencial y búsqueda de blancos.....	27
Análisis de enriquecimiento de vías.....	28
Plásmidos.....	28
Líneas celulares y transfecciones.....	29
Análisis estadístico.....	30
Resultados.....	31
El ambiente enriquecido reestablece el metabolismo de la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.....	31

El ambiente enriquecido aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye la acumulación de lípidos en el hígado	36
El ambiente enriquecido disminuye la inflamación en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa	38
El ambiente enriquecido aumenta los niveles de marcadores de lipólisis y de tejido adiposo pardo en el tejido adiposo blanco	41
El ambiente enriquecido regula la expresión de microRNAs en el hipotálamo en respuesta a una dieta alta en grasa	43
El ambiente enriquecido altera la expresión de microRNAs que regulan señales orexigénicas	49
El ambiente enriquecido regula microRNAs cuyos blancos putativos regulan la señalización de insulina y disminuye la inflamación en el hipotálamo de ratones alimentados con una DAG	55
Discusión.....	59
Conclusiones.....	68
Perspectivas.....	69
Referencias	70
Apéndice I: Figuras suplementarias.....	86
Apéndice II: Tablas suplementarias.....	90
Apéndice III: Plásmidos.....	119
Apéndice IV: Protocolos	128
Apéndice V: Publicaciones	131
An enriched environment re-establishes metabolic homeostasis by reducing obesity-induced inflammation	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Área bajo la curva	LPS - Lipopolisacárido
Act - Actina	MAPK - Proteína cinasa activada por mitógeno
AE - Ambiente enriquecido	MCH - hormona concentradora de melanina
AgRP - Péptido relacionado a Agauti	Mgl2 - Lectina de macrófago 2
AMPK - Proteína cinasa activada por adenosín monofosfato	miRNA - microRNA
AN - Ambiente normal	Mrc1 - Receptor de manosa tipo C 1
ARC - Núcleo arcuato del hipotálamo	mRNA - RNA mensajero
BDNF - Factor neurotrófico derivado de cerebro	mTOR - Blanco de Rapamicina en mamíferos
CART - Transcrito regulado por cocaína y anfetamina	NF-kB - Factor nuclear kappa B
CCL - Ligando de quimiocina con motivo C-C	NK - Natural killer
Cidea - Efectora A tipo DFFA inductor de muerte celular	NLRP3 - NLR Family Pyrin Domain Containing 3
Cox7a1 - Citocromo C oxidasa subunidad 7A1	NPY - Neuropeptido Y
CRH - hormona liberadora de corticotropina	ORX - Orexinas
DAG - dieta alta en grasa	PCR - Reacción en cadena de la polimerasa
DGCR8 - Región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge	PDK1 - Proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinosítido
DN - Dieta normal	Pdk4 - Piruvato deshidrogenasa cinasa 4
DNA - Ácido desoxirribonucleico	PI3K - Cinasa de inositol 3 fosfato
ELISA - Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	PIP3 - Inositol-3-fosfato
FDR - False discovery rate	piRNA - RNA asociado a Piwi
Foxo1 - Forkhead box O1	PKA - Proteína cinasa A
Gapdh - Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	PKC - Proteína cinasa C
H&E - Hematoxilina y eosina	POMC - Proopiomelanocortina
HRP - peroxidasa de rábano	Prdm16 - PR/SET dominio 16
HSL- Lipasa sensitiva a hormonas	pre-miRNA - Precursor de microRNA
IDE - Enzima degradadora de insulina	PRI - Prueba de resistencia a la insulina
IGF - Factor de crecimiento insulínico	pri-miRNA - Transcrito primario de microRNA
IGF1R - Receptor de IGF1	proBDNF - Precursor del factor neurotrófico derivado de cerebro
IKK - Cinasa del inhibidor del factor nuclear kappa B	PTG - Prueba de tolerancia a la glucosa
IL - Interleucina	PVN - Núcleo paraventricular del hipotálamo
IMC - índice de masa corporal	qPCR - PCR en tiempo real
IR - Receptor de leptina	RISC - Complejo silenciador inducido por RNA
IRS - Sustrato del receptor de insulina	RNA - Ácido ribonucleico
JAK2 - Cinasa de Janus 2	SOCS3 - Proteína supresora de la señalización por citocinas-3
JNK - Cinasa N-terminal de c-Jun	STAT3 - Transductor de señal y activador de la transcripción 3
KO - Knockout	TLR - Receptor tipo Toll
LEPR - Receptor de leptina	TNF - Factor de necrosis tumoral
LHA - Área lateral hipotalámica	TRH - Hormona liberadora de tirotrópina
	TRKB - Cinasa B relacionada a tropomiosina
	UBC - Ubiquinona reductasa subunidad A10
	Ucp1 - Proteina desacoplante 1

RESUMEN

La obesidad es un problema creciente de salud a nivel mundial y se caracteriza por generar un proceso inflamatorio crónico de bajo grado en diferentes tejidos. Este proceso inflamatorio lleva al reclutamiento de células del sistema inmune al tejido adiposo, inhibiendo la señalización de insulina y propiciando el desarrollo de alteraciones metabólicas. En el cerebro, este proceso inflamatorio genera resistencia a la insulina y a la leptina, inhibiendo la capacidad del hipotálamo de regular el balance energético. Aun así, diferentes estudios han determinado que la inhibición de diferentes vías inflamatorias, incluyendo las vías de IKK/NF- κ B, de JNK y del inflamasoma, disminuye la ganancia de peso y aumenta la sensibilidad a la insulina en modelos murinos de obesidad. El ambiente enriquecido se refiere a condiciones habitacionales que favorecen la activación de diferentes regiones del cerebro promoviendo una estimulación social, motora y somatosensorial. Ha sido ampliamente estudiado por tener efectos benéficos en el sistema nervioso central, donde se ha caracterizado que puede aumentar los niveles de neurotrofinas, la potenciación a largo plazo, además de la memoria y el aprendizaje. Adicionalmente, el ambiente enriquecido puede inhibir la respuesta inflamatoria en el cerebro y regular la activación del sistema inmune. Dado estos antecedentes, nosotros decidimos estudiar si el ambiente enriquecido puede restablecer el balance energético en ratones que presentan alteraciones metabólicas utilizando un modelo murino de obesidad inducida por dieta.

Encontramos que el ambiente enriquecido disminuyó la ingesta de alimento y aumentó la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones que presentan obesidad. Adicionalmente, el ambiente enriquecido disminuyó la acumulación de lípidos y aumentó la señalización de insulina en el hígado. En el tejido adiposo observamos que los ratones expuestos al ambiente enriquecido presentaron una disminución en el reclutamiento de macrófagos y en los niveles de citocinas inflamatorias, además de que observamos un aumento en los niveles de marcadores de lipólisis y de browning. En el hipotálamo el ambiente enriquecido disminuyó los niveles de proteínas clave en la señalización de JNK y de IKK/NF- κ B. Al medir la expresión de microRNAs en el hipotálamo, observamos que el ambiente enriquecido disminuyó la expresión de microRNAs que son aumentados por la administración de una dieta alta en grasa. Además de que observamos microRNAs cuya expresión aumentó específicamente en el hipotálamo de los ratones expuestos al ambiente enriquecido. Dentro de las vías enriquecidas para los blancos putativos de los microRNAs regulados por el ambiente enriquecido encontramos a la vía de señalización de insulina, la vía de señalización de neurotrofinas y la vía de AKT-Foxo1. Utilizando un modelo in-vitro validamos la regulación de Foxo1 por el miR-96, y la regulación de la neurotrofina BDNF por los microRNAs miR-182 y miR-151-5p. Finalmente, observamos que los niveles proteicos de FOXO1 y BDNF aumentaron en el hipotálamo de los ratones que estuvieron en el ambiente enriquecido. Con estos resultados proponemos que el ambiente enriquecido podría ser utilizado como terapia para contrarrestar la inflamación y las alteraciones metabólicas causadas por la obesidad.

ABSTRACT

Obesity is a worldwide health issue characterized by the development of a low grade chronic inflammatory process in different tissues. This obesity-associated inflammation increases immune cell recruitment and activation in the adipose tissue, leading to the development of insulin resistance and metabolic alterations. In the brain, this inflammatory process generates insulin and leptin resistance, inhibiting the ability of the hypothalamus to maintain energy balance. However, several studies have shown that inhibiting different inflammatory pathways, including the IKK/NF- κ B, JNK or inflammasome pathways, can lead to a decrease in food intake and improved insulin sensitivity in obesity models. An enriched environment refers to housing conditions that promote the activation of different brain regions by increasing social, motor and somatosensorial stimulation. It has been widely studied for having beneficial effects in the central nervous system, where it increases neurotrophin levels, long-term potentiation, as well as learning and memory in murine models. Additionally, an enriched environment has been shown to decrease inflammation in the brain and to regulate the activation of the immune system. Given these data we wanted to determine if an enriched environment could restore energy balance in mice with metabolic alterations using a murine model of diet-induced obesity.

We found that an enriched environment decreased food intake, increased glucose tolerance and insulin sensitivity in mice that still presented obesity. We also found that the enriched environment decreased hepatic steatosis and increased insulin signaling in the liver. In the adipose tissue the enriched environment inhibited the recruitment of macrophages and decreased the levels of inflammatory cytokines, while it increased the levels of lipolysis and browning markers. Additionally, we found that the enriched environment decreased the protein levels of key mediators of the JNK and IKK/NF- κ B pathways in the hypothalamus. We determined the expression of microRNAs in the hypothalamus and found that the enriched environment decreased the expression of microRNAs that are upregulated by a high fat diet feeding. We also observed that the enriched environment upregulated the expression of a specific subset of microRNAs in the hypothalamus. We determined that the insulin, neurotrophin, and AKT-Foxo1 signaling pathways were enriched among the putative targets of the microRNAs found in our study. Using an in-vitro model we validated the regulation of the 3' UTRs of *Foxo1* by miR-96, and of the neurotrophin *Bdnf* by miR-182 and miR-151. Finally, we determined that the protein levels of FOXO1 and BDNF were increased in the hypothalamus of the mice housed in an enriched environment. Overall, we found that an enriched environment can reduce inflammation and ameliorate the metabolic alterations caused by obesity. We propose that the enriched environment could be used as a novel non-invasive therapeutic approach to treat obesity-related metabolic alterations.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es un padecimiento que se genera por un desbalance entre el consumo y el gasto de energía en el organismo lo que lleva a una acumulación excesiva de grasa, se considera que una persona tiene obesidad cuando presenta un índice de masa corporal (IMC) mayor a 30 kg/m². El desarrollo de obesidad es controlado o propiciado por diferentes factores que interactúan entre ellos como el fondo genético, factores ambientales, de conducta, entre otros (Blüher, 2019; Nguyen y El-Serag, 2010). En las últimas décadas la obesidad ha aumentado drásticamente a nivel mundial, donde en México las personas con obesidad representan más de un tercio de la población adulta (Barquera et al., 2020; Shamah-Levy et al., 2020). Adicionalmente, México ocupa el primer lugar a nivel mundial en obesidad infantil (Aceves-Martins et al., 2016; Shamah-Levy et al., 2018). La obesidad representa un problema de salud pública dado que aumenta el riesgo de padecer otras enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, y diabetes tipo II, además de reducir la esperanza de vida (Barquera et al., 2020; Hotamisligil, 2006). En México se estima que el 14% de la población mayor a 20 años padece de diabetes tipo II (Shamah-Levy et al., 2020), siendo de las primeras 3 causas de muerte a nivel nacional. Dado esto, resulta importante entender los mecanismos que regulan el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas para proveernos de herramientas para generar nuevas estrategias terapéuticas.

REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO EN EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es el centro regulador de la homeostasis del organismo ya que tiene la capacidad de interpretar e integrar diferentes señales internas y del entorno para dar una respuesta mediante la regulación del sistema neuroendocrino. El hipotálamo regula diferentes funciones como el ciclo del sueño, la temperatura corporal, el flujo sanguíneo, la respuesta a estrés, la respuesta inmune y el balance energético (Bao et al., 2008; Marino et al., 2011; Marques-Deak et al., 2005). La leptina es una adipocina que es secretada por los adipocitos en proporción al estado de adiposidad, mientras que la insulina es una hormona secretada por el páncreas en respuesta a los niveles de glucosa en sangre y sus niveles también son proporcionales al peso corporal, el hipotálamo censa los niveles de estas hormonas lo que le proporciona información acerca del estado nutricional del organismo (Marino et al., 2011; Morton et al., 2006).

En el hipotálamo mediobasal, el núcleo arcuato (ARC) cuenta con dos poblaciones diferentes de neuronas que expresan a los receptores de insulina y de leptina; 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) (Kohno y Yada, 2012; 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 (Leininger, 2011; Saito y Nagasaki, 2008). Adicionalmente, las neuronas anorexigénicas del ARC inervan el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo donde regulan a las poblaciones neuronales que expresan a la hormona liberadora de tirotropina (TRH) o a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) las cuales tienen un papel anorexigénico y catabólico (Lechan y Fekete, 2006; Remmers y Delemarre-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 et al., 2006).

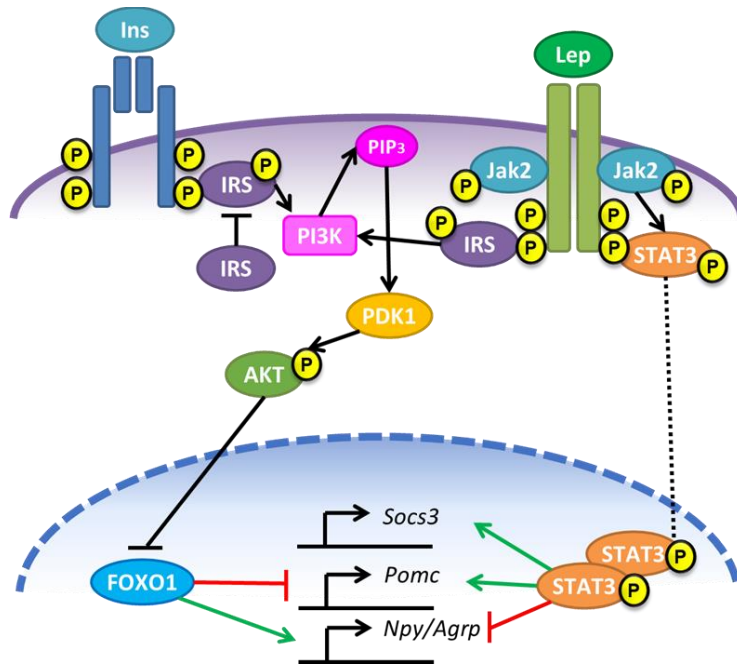


Figura 1 – señalización de insulina y leptina en el hipotálamo

Figura basada en Gregor y Hotamisligil, 2011; Morton et al., 2006; Morton y Schwartz, 2010; Taniguchi et al., 2006.

La insulina señala a través del receptor de insulina (IR), un receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina. Cuando la insulina se une a su receptor este se activa a través de su autofosforilación, lo cual permite que la proteína sustrato del receptor de insulina (IRS) se una a él y sea fosforilado en residuos de tirosina lo cual media su activación (Folli et al., 1996; Shaw, 2011). IRS activa a la cinasa de inositol 3 fosfato (PI3K) para formar inositol-3-fosfato (PIP3), lo cual permite el reclutamiento y activación de AKT por la proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinosítido (PDK1) (Saltiel y Kahn, 2001). AKT es un mediador clave de la acción de la insulina, regulando la activación de blancos importantes en diferentes tejidos, entre ellos Foxo1 (Taniguchi et al., 2006). En el hipotálamo la proteína Forkhead box O1 (Foxo1) induce la expresión de *Npy* y *Agrp* e inhibe la transcripción de *Pomc* (Iskandar et al., 2010; Kim et al., 2006; Kitamura et al., 2006). Como producto de la señalización de insulina, AKT fosforila a Foxo1 lo cual impide su

traslocación al núcleo permitiendo la transcripción de *Pomc* y disminuyendo los niveles de *Npy* y *Agrp* (Kim et al., 2006) (Figura 1).

La leptina señala a través del receptor de leptina (LEPR), el cual sufre un cambio conformacional al interactuar con su ligando, activando a la cinasa de Janus 2 (JAK2), llevando a su autofosforilación y a la fosforilación del receptor de leptina (Amitani et al., 2013). El factor de transcripción STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) reconoce los sitios fosforilados en el receptor de leptina lo cual permite que sea activado por JAK2 (Ahima y Osei, 2004; Carvalheira et al., 2001). La fosforilación de STAT3 promueve su dimerización y traslocación al núcleo para mediar la regulación de sus genes blanco (Harvey y Ashford, 2003; Morton et al., 2006). En el hipotálamo, STAT3 favorece la expresión de *Pomc* e inhibe la expresión de *Npy* y *Agrp* (Belgardt et al., 2009; Xu et al., 2007) (Figura 1). La cinasa JAK2 también puede fosforilar y activar a IRS1, llevando a la activación de la señalización descrita para la vía de insulina (Morton et al., 2006; Park y Ahima, 2015). La insulina y la leptina actúan en conjunto regulando la activación de neuronas y expresión de genes involucrados en la regulación del balance energético, por lo que la inhibición de estas vías de señalización impide la correcta regulación de la ingesta y del gasto energético para mantener la homeostasis favoreciendo el desarrollo de la obesidad (Ahima y Osei, 2004; Amitani et al., 2013; Marino et al., 2011; Morton y Schwartz, 2011).

OBESIDAD E INFLAMACIÓN

Diferentes estudios han determinado que un estado de sobre nutrición genera un proceso inflamatorio crónico de bajo grado conocido como meta inflamación, que ha sido caracterizado en varios tejidos como el hígado, páncreas, tejido adiposo y en el cerebro (Lumeng y Saltiel, 2011). En pacientes con obesidad se ha observado un aumento en circulación de la proteína C reactiva, citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1 β , IL6), y quimiocinas, al igual que un estado de hiperglucemia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia (Bastard et al., 2006; Ellulu et al., 2017; Esser et al., 2014; Gregor y Hotamisligil, 2011). Adicionalmente, se ha relacionado el aumento en estos marcadores inflamatorios con la generación de resistencia a la insulina y el desarrollo de diabetes tipo II (Hotamisligil et al., 1995; Spranger et al., 2003; Wang et al., 2013).

El tejido adiposo blanco es el principal reservorio de lípidos en el organismo, además de funcionar como un sensor del estado energético del organismo. En el tejido adiposo residen diferentes células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos T CD4 y eosinófilos (McLaughlin et al., 2017; Saltiel y Olefsky, 2017). Los adipocitos secretan adiponectina que mantiene a las células del sistema inmune en un fenotipo anti-inflamatorio, donde los macrófagos se encuentran en un estado de activación M2 y predominan los linfocitos CD4 Th2 y T reguladores, además de niveles elevados de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 (Boutens y Stienstra, 2016; Ji et al., 2012; Lumeng et al., 2007; Zeyda et al., 2007). En un estado de sobre nutrición, el exceso de nutrientes lleva al crecimiento de los adipocitos, generando un aumento en los niveles de leptina y una disminución en los niveles de adiponectina (Fantuzzi, 2005; Xu et al., 2003b).

Este crecimiento del tejido adiposo lleva a la activación de vías de estrés celular (entre ellas hipoxia, estrés mecánico y estrés de retículo endoplásmico) induciendo la secreción de citocinas inflamatorias y quimiocinas (Reilly y Saltiel, 2017; Xue et al., 2019). Estas moléculas llevan al reclutamiento y activación de diferentes células del sistema inmune, favoreciendo la activación M1 de macrófagos, la activación Th1 de linfocitos T CD4 y al infiltrado de linfocitos T CD8, los cuales exacerban el proceso inflamatorio (Brestoff y Artis, 2015; Lumeng et al., 2007; Nishimura et al., 2009; Strissel et al., 2007; Weisberg et al., 2003). Adicionalmente, se ha descrito que durante la obesidad se observa la muerte celular de algunos adipocitos, lo que lleva a la formación de estructuras de tipo corona donde el adipocito en proceso de muerte es rodeado por macrófagos (Cinti et al., 2005; Strissel et al., 2007). Aunque se ha comprobado que los adipocitos pueden secretar diferentes moléculas inflamatorias, se ha determinado que los macrófagos son los principales productores de citocinas en el tejido adiposo en un estado de obesidad (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003b).

La inflamación asociada a la obesidad se caracteriza por la activación de las vías de JNK, IKK/NF- κ B, PKC y del inflamasoma de NLRP3, al igual que a un aumento en los niveles de las citocinas TNF, IL-1 β , e IL-6 y de las quimiocinas CCL2 y CCL3 en el tejido adiposo (Arkan et al., 2005; Bashan et al., 2007; Gregor y Hotamisligil, 2011; Sabio y Davis, 2010; Schmitz-Peiffer y Biden, 2008; Vandanmagsar et al., 2011). Este proceso inflamatorio impide la función correcta del tejido adiposo, llevando al desarrollo de resistencia a la insulina, a la inhibición de la señalización de catecolaminas y a una disfunción en el metabolismo de lípidos (Reilly y Saltiel, 2017). En el hígado, un estado de obesidad lleva a la activación de las células de Kupffer y un aumento en los niveles de las citocinas TNF, IL-6 e IL-1 β , favoreciendo la desregulación del metabolismo de glucosa y de lípidos, contribuyendo al desarrollo esteatosis hepática y a la inhibición en la señalización de insulina en el hígado (Cai et al., 2005; Jensen et al., 2018; Koyama y Brenner, 2017). En el páncreas, un estado prolongado de obesidad genera un aumento en la expresión de marcadores inflamatorios y en el infiltrado de células del sistema inmune, lo cual favorece la muerte de las células beta pancreáticas disminuyendo la liberación de insulina (Ehses et al., 2007; Esser et al., 2014; Gukovsky et al., 2013). Adicionalmente, la obesidad genera cambios en la composición de la microbiota intestinal y a la alteración de la permeabilidad del intestino, lo cual lleva a un aumento de los niveles de LPS en circulación, contribuyendo al proceso inflamatorio en el resto del organismo (Cox et al., 2015).

LA OBESIDAD GENERA INFLAMACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Diferentes estudios han demostrado que la obesidad también tiene un impacto negativo sobre la función del sistema nervioso central, donde se ha asociado con un aumento en el deterioro cognitivo y con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades psiquiátricas, derrame cerebral y enfermedades neurodegenerativas (Castanon et al., 2014; Karczewski et al., 2022; Spyridaki et al., 2016). En modelos murinos se ha determinado que la alimentación con una dieta alta en grasa (DAG) disminuye la expresión de neurotrofinas, la longitud y arborización dendrítica, la plasticidad sináptica, la neurogénesis adulta y

promueve la muerte neuronal (Cai, 2013; Farr et al., 2008; Jeon et al., 2012; Karimi et al., 2013; Li et al., 2012; Liu et al., 2014a; Moraes et al., 2009; Stranahan et al., 2008). También se ha observado un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y en el reclutamiento de macrófagos periféricos al cerebro (Buckman et al., 2014; Hargrave et al., 2016; Stranahan et al., 2016; Van Dyken y Lacoste, 2018). Similar a lo que se ha observado en la periferia, diferentes estudios han reportado la presencia de un proceso inflamatorio en diferentes regiones del cerebro como el hipocampo, corteza, cerebelo, amígdala, tallo cerebral y en el hipotálamo en modelos de obesidad en murinos (De Souza et al., 2005; Guillemot-Legrís et al., 2016; Jeon et al., 2012; O'Brien et al., 2017; Tapia-González et al., 2011). Adicionalmente, se ha descrito la activación de la vía de TLR4, IKK/NF- κ B, y de JNK, un aumento en la expresión de citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF, al igual que un aumento en la astrogliosis y microgliosis en el cerebro (Fourrier et al., 2019; Guillemot-Legrís y Muccioli, 2017; Guillemot-Legrís et al., 2016; Jeon et al., 2012; Tapia-González et al., 2011). La activación de estas vías inflamatorias se ha asociado con una disminución en el aprendizaje y la memoria, al igual que un aumento en comportamientos de ansiedad y depresión en modelos murinos (Farr et al., 2008; Fourrier et al., 2019; Jeon et al., 2012; Spyridaki et al., 2016).

En el hipotálamo la obesidad lleva a la inhibición de la señalización de leptina e insulina, lo que impide la correcta regulación de la ingesta y del gasto de energía (Thaler y Schwartz, 2010). Diferentes estudios también han reportado que la expresión de los péptidos orexigénicos y anorexigénicos se ve alterada en el hipotálamo de modelos de obesidad en murinos (Moraes et al., 2009; Nakata et al., 2017; Sabio et al., 2010). Adicionalmente, se ha observado un aumento en la muerte neuronal y una disminución en el número neuronas POMC en el hipotálamo en respuesta a la alimentación con una DAG (Li et al., 2012; Moraes et al., 2009), lo cual también contribuye a la pérdida del balance energético. En el hipotálamo, el proceso inflamatorio asociado a la obesidad esta caracterizado por la activación de la vía de JNK (De Souza et al., 2005), de IKK/NF- κ B (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 por la sobreexpresión de SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) (Münzberg et al., 2004), y por un aumento en los niveles de IL-1 β , TNF e IL-6 (Milanski et al., 2009), que correlacionan temporalmente con el desarrollo de la resistencia a la leptina e insulina. En conjunto estos procesos impiden la función correcta del hipotálamo, rompiendo el balance energético y favoreciendo el desarrollo de obesidad.

LA INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN DISMINUYE LAS ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD

La relevancia del proceso inflamatorio en el desarrollo de alteraciones metabólicas propiciadas por la obesidad se ha determinado inhibiendo diferentes componentes de las vías inflamatorias. Los ratones deficientes de IKK β , JNK1, PKC θ , TLR4 y NLRP3 presentan una disminución en la activación de la inflamación, un aumento en la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa, y en algunos casos una pérdida de adiposidad y ganancia de peso en modelos de obesidad genética o inducida por dieta (Hirosumi et al., 2002; Kim et al., 2004; Orr et al., 2012; Vandanmagsar et al., 2011; Yuan et al., 2001). De forma

interesante, se ha visto que la inhibición de la inflamación en ciertos tejidos o tipos celulares (dentro de ellos macrófagos, hígado, tejido adiposo y neuronas) puede tener efectos benéficos en todo el organismo. La deficiencia de IKK β en hepatocitos no afecta la ganancia de peso en ratones alimentados con una DAG pero mejora la tolerancia a la glucosa, además de aumentar la sensibilidad a la insulina en el hígado (Arkan et al., 2005). Los ratones knockout para JNK1 en el tejido adiposo presentan mayor sensibilidad a la insulina, un aumento en la señalización de insulina en el tejido adiposo y en el hígado, y una disminución en la esteatosis hepática (Sabio et al., 2008). La ausencia de IKK β en el linaje mielóide reduce la ganancia de peso en ratones alimentado con una DAG y también aumenta la tolerancia a la glucosa (Arkan et al., 2005). Mientras que la deficiencia de JNK1 y JNK2 en macrófagos previene la generación de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, aumenta la señalización de insulina en musculo, tejido adiposo e hígado, y disminuye la inflamación en el tejido adiposo en un modelo de obesidad inducida por dieta (Han et al., 2013). A diferencia de los estudios mencionados previamente, la delección de JNK1 en musculo no tiene efectos benéficos en el metabolismo de ratones alimentados con una DAG (Pal et al., 2013).

En cuando al sistema nervioso central, la ausencia de MyD88 en neuronas, un componente esencial de la vía de señalización de TLR4, disminuye la ingesta y la adiposidad, recupera la tolerancia a la glucosa y disminuye la resistencia a la insulina, además de rescatar la señalización de leptina en ratones alimentados con una DAG (Kleinridders et al., 2009). Adicionalmente, la delección o inhibición farmacológica de JNK1 en el sistema nervioso aumenta la sensibilidad a la insulina y previene el desarrollo de obesidad inducida por una dieta mediante una disminución en la ingesta de alimento, un aumento de la actividad física y del gasto de energía, generado por un aumento en la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (Belgardt et al., 2010; Benzler et al., 2013; Sabio et al., 2010). En el hipotálamo, la delección o inhibición farmacológica de IKK β lleva a una disminución en la ingesta y en la ganancia de peso en modelos de obesidad en ratones (Posey et al., 2009; Zhang et al., 2008). De forma interesante, la activación constitutiva de IKK β o la sobre expresión de SOCS3 específicamente en el hipotálamo llevan a la inhibición de la vía de insulina y de leptina, además de a un aumento en la ingesta y en la ganancia de peso (Zhang et al., 2008).

Estos datos en conjunto sugieren que la obesidad y un estado de inflamación crónico en el organismo conducen 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.

ANTECEDENTES

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REGULA AL SISTEMA NERVIOSO Y AL SISTEMA INMUNE

Estudios previos han demostrado que el desarrollo de obesidad está regulado por diferentes factores ambientales (Blüher, 2019). En este estudio nos interesó evaluar el uso de terapias no invasivas que tuvieran un efecto en la regulación del proceso inflamatorio, por lo que decidimos enfocarnos en estudiar el efecto del ambiente enriquecido. El ambiente enriquecido (AE) se define como condiciones habitacionales que promueven una estimulación motora, somatosensorial, social y cognitiva a comparación de las condiciones estándar (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Esto se logra incluyendo diferentes objetos y juguetes en las jaulas de los animales, donde es importante mantener la complejidad y novedad en el ambiente para favorecer una estimulación cognitiva y somatosensorial (Abou-Ismaïl, 2011; Gubert y Hannan, 2019). Adicionalmente, en el AE se favorece la estimulación motora utilizando cajas de mayor tamaño o ruedas de ejercicio, al igual que la interacción social al aumentar el número de animales habitados en una misma jaula (Simpson y Kelly, 2012). El modelo de AE ha sido principalmente estudiado en el sistema nervioso central, donde se sabe que lleva a la activación de diferentes regiones como la corteza cerebral, el hipocampo y el hipotálamo (Ali et al., 2009). Adicionalmente, el AE aumenta la densidad de espinas dendríticas (Johansson y Belichenko, 2002), la arborización y longitud dendrítica (Faherty et al., 2003; Leggio et al., 2005), el número de contactos sinápticos (Hosseiny et al., 2014), los niveles de diferentes neurotrofinas (Falkenberg et al., 1992; Ickes et al., 2000), la potenciación a largo plazo (Hosseiny et al., 2014), la neurogénesis adulta (Hosseiny et al., 2014; van Praag et al., 1999), además de mejorar la memoria y el aprendizaje (Falkenberg et al., 1992; Hosseiny et al., 2014; Ickes et al., 2000; Leggio et al., 2005). El impacto del paradigma de AE también ha sido estudiado en diferentes patologías del sistema nervioso central, incluyendo desórdenes del neurodesarrollo, modelos de daño cerebral y de enfermedades neurodegenerativas (Griñan-Ferré et al., 2016; Liu et al., 2021; Queen et al., 2020). En modelos de autismo se ha visto que el ambiente enriquecido disminuye la ansiedad y aumenta el comportamiento social (Gubert y Hannan, 2019; Queen et al., 2020). De igual forma, el AE disminuye el deterioro cognitivo y conductas indicativas de depresión en un modelo de estrés crónico (Shen et al., 2019). En modelos de isquemia cerebral el AE favorece la recuperación, disminuyendo el daño oxidativo, la inflamación y la neurodegeneración (Jeffers y Corbett, 2018; Liu et al., 2021). En modelos de la enfermedad de Alzheimer, el AE disminuye los niveles del péptido β -amiloide, placas seniles, Tau fosforilado y la astrogliosis, previniendo el deterioro cognitivo (Griñan-Ferré et al., 2016; Maesako et al., 2012; Nakano et al., 2020).

De forma interesante, diferentes estudios han demostrado que el AE regula la respuesta inflamatoria en el cerebro (Ali et al., 2019; Birch y Kelly, 2019; Chabry et al., 2015; Keymoradzadeh et al., 2020; McMurphy et al., 2018; Silva et al., 2020; Williamson et al., 2012; Xiao et al., 2019). En un modelo de inflamación por

inyección de LPS, el AE reduce los niveles de citocinas inflamatorias y quimiocinas en el hipocampo, además de que favorece la memoria y aprendizaje (Keymoradzadeh et al., 2020; Williamson et al., 2012). Así mismo, el AE disminuye la expresión de marcadores inflamatorios en la microglía y macrófagos cerebrales en un modelo de depresión inducida por glucocorticoides (Chabry et al., 2015). En un modelo de daño cortical, se reportó que el AE reduce la ansiedad, mejora la memoria y el aprendizaje, disminuyendo diferentes marcadores inflamatorios incluyendo la activación de microglía y astrocitos (Silva et al., 2020). El AE también disminuye el daño en el cerebro en un modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune a través de regular el desarrollo y función de linfocitos T (Xiao et al., 2019). Adicionalmente, el AE reduce el deterioro cognitivo, promueve la neurogénesis, inhibe la apoptosis y disminuye los niveles de marcadores inflamatorios en el cerebro durante el envejecimiento (Birch y Kelly, 2019; McMurphy et al., 2018).

De forma interesante, en años recientes se ha empezado a estudiar el efecto del AE fuera del sistema nervioso central, donde se ha observado que altera los niveles de diferentes hormonas y regula el desarrollo y función del sistema inmune (Bakos et al., 2009; Marashi et al., 2003). El AE modula la proliferación, diferenciación y activación de linfocitos T, linfocitos B y células natural killer (NK) (Gurfein et al., 2017; Meng et al., 2019; Xiao et al., 2019; Zarif et al., 2018). Adicionalmente, se ha reportado que la exposición al AE mejora la función de células del sistema inmune durante el envejecimiento, previniendo la senescencia de macrófagos, linfocitos y células NK (Arranz et al., 2010). En modelos de cáncer el AE aumenta la función antitumoral de linfocitos CD8 y células NK (Song et al., 2017; Xiao et al., 2016). En relación con la obesidad, se ha observado que el AE previene la ganancia de peso en ratones favoreciendo el browning del tejido adiposo blanco y un aumento en el gasto energético (Cao et al., 2011). Adicionalmente, nosotros previamente demostramos que el AE puede revertir el desarrollo de alteraciones metabólicas en un modelo de obesidad inducido por dieta (Díaz de León-Guerrero, 2013).

El AE ejerce sus efectos benéficos a diferentes niveles; puede regular la transcripción génica (Hüttenrauch et al., 2016; Rampon et al., 2000), modificar el estado de metilación de CpGs en el DNA y marcas epigenéticas de histonas (Kuzumaki et al., 2011; Zocher et al., 2021), favorecer la secreción de exosomas (Nakano et al., 2020; Pusic y Kraig, 2014), y regular la expresión de microRNAs (Barak et al., 2013; Nakano et al., 2020; Shen et al., 2019).

MICRORNAs COMO AGENTES REGULADORES DE LA OBESIDAD

Los microRNAs son RNAs pequeños (21-22 nucleótidos) no codificantes que tienen un papel en la regulación postranscripcional (Ameres y Zamore, 2013). Los microRNAs se transcriben de genes específicos los cuales dan lugar a un solo microRNA o se pueden encontrar en clústeres que producen varios microRNAs, también pueden originarse a partir de intrones o de RNAs no codificantes largos (Gebert y MacRae, 2019). El transcrito primario del microRNA (pri-miRNA) forma una estructura tallo-asa que es procesada por un complejo microprocesador formado por la ribonucleasa Drosha y la proteína de unión a

RNA de doble cadena DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) en el núcleo para formar un precursor del microRNA (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos (Ha y Kim, 2014). El pre-miRNA es exportado del núcleo donde es reconocido y procesado por la ribonucleasa DICER para dar lugar a un dúplex de microRNAs maduros de 21-22 nucleótidos llamados miR-5p o miR-3p dependiendo de la cadena de la cual proviene, en la mayoría de los casos solo una de las hebras tiene funcionalidad mientras que la otra es degradada (He y Hannon, 2004). El microRNA maduro es cargado en un complejo silenciador inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés) el cual media la inhibición de la traducción o la degradación del RNA mensajero blanco mediado por proteínas de la familia Argonauta (Ameres y Zamore, 2013; Gebert y MacRae, 2019). En animales, los microRNAs poseen una región de 6-8 nucleótidos llamada región semilla la cual media la unión a sus genes blanco principalmente en la región 3'UTR del RNA mensajero (mRNA) (Grimson et al., 2007). Adicionalmente, se ha observado que un solo microRNA puede regular a varios blancos además de que cada mRNA puede ser regulado por varios microRNAs (Friedman et al., 2009). Diferentes estudios han mostrado que la expresión de los microRNAs es regulada durante el desarrollo, además de tener una expresión específica en diferentes tejidos y tipos celulares (Landgraf et al., 2007; Wienholds y Plasterk, 2005). La función de los microRNAs ha sido ampliamente estudiada en diferentes procesos como la proliferación, diferenciación, en la regulación de vías de señalización, al igual que su papel en el desarrollo de diferentes enfermedades (Dong et al., 2013; He y Hannon, 2004; Wienholds y Plasterk, 2005). Así mismo, se ha visto que los microRNAs pueden regular al sistema inmune y la inflamación (Lindsay, 2008; Ma et al., 2011).

En cuanto a la obesidad, se ha reportado que los microRNAs juegan un papel importante en la diferenciación del tejido adiposo, y su expresión se ve alterada en modelos de obesidad y diabetes en diferentes tejidos (Arner y Kulyté, 2015; Heneghan et al., 2010; Iacomino y Siani, 2017). Así mismo, se ha identificado que la expresión de ciertos microRNAs en circulación puede servir como biomarcadores de obesidad y alteraciones metabólicas en pacientes (Ortega et al., 2013; Pescador et al., 2013). De forma interesante, se ha determinado que algunos microRNAs pueden regular la vía de señalización de insulina (Chakraborty et al., 2014; Nigi et al., 2018). Específicamente, el miR-7 inhibe la señalización de insulina en neuronas, regulando los niveles del receptor de insulina, de IRS2 y de la enzima degradadora de insulina (IDE por sus siglas en inglés) (Fernández-de Frutos et al., 2019). De igual forma, el miR-139 puede regular a IRS1, inhibiendo la vía de señalización de insulina y la diferenciación de adipocitos (Mi et al., 2015). El microRNA let-7 también regula diferentes genes de la vía de insulina, entre ellos el receptor de insulina, el receptor de IGF1 (IGF1R) y a IRS2, además de que su sobreexpresión en ratones favorece el desarrollo de intolerancia a la glucosa (Zhu et al., 2011). Adicionalmente, diferentes estudios han propuesto que los microRNAs pueden funcionar como agentes terapéuticos, donde se ha determinado que la sobreexpresión de los microRNAs miR-206, miR-26a, miR-130-3p o la inhibición del miR-155, disminuyen la ganancia de peso y aumentan la sensibilidad a la insulina (Fu et al., 2015; Gaudet et al., 2016; Wu et al., 2017; Xiao et al., 2014).

En el cerebro se ha visto que los microRNAs se expresan de forma diferencial en distintas regiones y tipos celulares (Bak et al., 2008; Jovičić et al., 2013). En el hipotálamo se ha caracterizado la expresión de microRNAs específicos (Choi et al., 2013) y su expresión diferencial en los distintos núcleos hipotalámicos (Amar et al., 2012). También se ha observado que diferentes condiciones como el estrés osmótico, la falta de sueño y la obesidad pueden regular la expresión de microRNAs en el hipotálamo (Crépin et al., 2014; Davis et al., 2007; Derghal et al., 2015; Lee et al., 2006; Sangiao-Alvarellos et al., 2014). De forma interesante, se ha observado que la delección de la enzima procesadora de microRNAs DICER en neuronas hipotalámicas genera hiperfagia y lleva al desarrollo de obesidad (Schneeberger et al., 2012; Vinnikov et al., 2014), lo cual sugiere un papel importante de los microRNAs en la regulación del balance energético.

Dado que el AE activa diferentes regiones del cerebro, regula la respuesta inflamatoria, la producción de neurotrofinas y la expresión de microRNAs, en este estudio nos interesó caracterizar el efecto del AE en ratones que presentan alteraciones metabólicas causadas por la alimentación de una dieta alta en grasa.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el desarrollo de alteraciones metabólicas es un grave problema de salud que ha ido en aumento en las últimas décadas, disminuyendo la calidad y esperanza de vida en las personas que la padecen. Para elucidar los mecanismos que contribuyen al desarrollo de la obesidad se han utilizado diferentes modelos en animales, donde se ha determinado que la alimentación de una dieta alta en grasa en modelos murinos recapitula varios componentes del desarrollo de obesidad y diabetes tipo II. Diferentes estudios han demostrado que la inflamación asociada a la obesidad juega un papel determinante en el desarrollo de resistencia a la insulina y alteraciones metabólicas. Adicionalmente, se ha determinado que el inhibir el proceso inflamatorio a nivel sistémico o en diferentes tejidos puede tener efectos benéficos en modelos de obesidad en ratones, teniendo un efecto en la disminución del peso corporal y adiposidad, además de un aumento en la sensibilidad a la insulina y en la tolerancia a la glucosa. Dado estos antecedentes se ha sugerido que terapias que regulen la inflamación podrían funcionar como tratamiento para lidiar con el desarrollo de alteraciones metabólicas producto de una obesidad.

Estudios anteriores han propuesto al ambiente enriquecido para el tratamiento de diferentes enfermedades en modelos animales y en pacientes. El ambiente enriquecido favorece la activación de diferentes regiones dentro del cerebro, incluyendo el hipotálamo que es una región clave en la regulación del balance energético. Adicionalmente, se ha observado que el ambiente enriquecido puede regular la activación del sistema inmune y del proceso inflamatorio en diferentes modelos murinos de enfermedades. Nosotros anteriormente habíamos determinado que el ambiente enriquecido disminuye las alteraciones metabólicas generadas por la alimentación de una dieta alta en grasa utilizando un modelo de obesidad inducida por dieta en ratón. Dados estos antecedentes nosotros decidimos determinar si el ambiente enriquecido podría inhibir el proceso inflamatorio generado por la obesidad para reestablecer el balance energético.

Adicionalmente, se ha identificado que los microRNAs tienen un papel importante en el desarrollo de diferentes patologías, incluyendo en la obesidad y diabetes tipo II. En el hipotálamo se ha descrito la sobreexpresión de diferentes microRNAs en modelos de obesidad en murinos. También se ha determinado que diferentes microRNAs pueden tener un papel inmunomodulador al inhibir la activación de vías inflamatorias. Dado que el ambiente enriquecido ejerce sus efectos a diferentes niveles de regulación, incluyendo la regulación de la expresión de microRNAs en el cerebro, también nos interesó determinar el papel de los microRNAs hipotalámicos en la regulación del balance energético en nuestro modelo.

HIPÓTESIS

El ambiente enriquecido reestablece el metabolismo de glucosa en ratones que presentan obesidad y alteraciones metabólicas a través de disminuir la inflamación.

OBJETIVO GENERAL

Definir si el ambiente enriquecido es capaz de regular el proceso inflamatorio y disminuir las alteraciones metabólicas generadas por una obesidad inducida por dieta.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar si el ambiente enriquecido tiene un efecto tiempo dependiente en el metabolismo de la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

Determinar si el ambiente enriquecido modula el proceso inflamatorio derivado de una obesidad en el tejido adiposo y en el hipotálamo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

Determinar si el ambiente enriquecido reestablece la señalización de insulina en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasa.

Determinar si el ambiente enriquecido modula la expresión de microRNAs que regulen vías involucradas en la regulación del balance energético en el hipotálamo.

MATERIALES Y MÉTODOS

RATONES, DIETAS Y CONDICIONES HABITACIONALES

74 ratones macho C57BL/6N fueron obtenidos de ENVIGO de 3-4 semanas de edad. Los ratones fueron separados de forma aleatoria en jaulas estándar (21 cm ancho x 29 cm largo x 16 cm de alto) con 5 ratones por jaula (Ambiente Normal). A las 6-7 semanas de edad (semana experimental 0) los ratones fueron divididos para continuar siendo alimentados con una dieta normal (DN, 2018SX ENVIGO Teklad Global) (n=30 ratones) o pasar a ser alimentados con una dieta alta en grasa (DAG, D12492, Research diets (n=44 ratones). En la tabla se muestra la composición de macronutrientes de las dietas utilizadas:

Componentes:	DN		DAG	
	% en gramos	% en kcal	% en gramos	% en kcal
Proteína	18.6	24	26.2	20
Carbohidrato	44.2	58	26.3	20
Grasa	13.2	18	34.9	60
Densidad energética	3.1 kcal/gr		5.24 kcal/gr	

La siguiente tabla muestra la proporción de lípidos en cada dieta (Valenzuela et al., 2016):

Lípidos:	DN		DAG	
	% del total	% de grasa	% del total	% de grasa
Ácido palmítico C16:0	0.7	12.5	6.47	20.9
Ácido esteárico C18:0	0.2	3.6	3.67	11.9
Ácido oleico C18:1 ω 9	1.2	21.4	11.2	36.2
Ácido linoleico C18:2 ω 6	3.1	55.4	7.34	23.8
Ácido linolénico C18:4 ω 3	0.3	5.4	0.54	1.7
Total de grasas saturadas	0.9	16.1	10.7	34.6
Total de grasas monoinsaturadas	1.3	23.2	11.9	38.5
Total de grasas poliinsaturadas	3.4	60.7	8.3	26.9
Colesterol	0 mg/kg		18 mg/kg	

Después de 13 semanas los ratones fueron divididos para continuar en el ambiente normal o para ser cambiados a un ambiente enriquecido (AE), manteniendo la misma dieta que habían tenido anteriormente. Se formaron 5 grupos experimentales: dieta normal ambiente normal (DN AN, n=15), dieta normal ambiente enriquecido (DN AE, n=15), dieta alta en grasa ambiente normal (DAG AN n=15), dieta alta en grasa ambiente enriquecido 1 mes (DAG AE 1M n=14) y dieta alta en grasa ambiente enriquecido 3 meses (DAG AE 3M, n=15). Los ratones fueron divididos entre las condiciones habitacionales de manera que se minimizara la diferencia en el peso promedio entre los grupos para cada dieta.

Para el diseño del ambiente enriquecido decidimos tomar como referencia el reportado por (Cao et al., 2010), donde utilizaban una caja grande llena de juguetes y otros objetos para poder habitar a más ratones juntos, con la excepción de que no incluimos ruedas de ejercicio en nuestro experimento. Utilizamos cajas

de mayor tamaño (32 cm ancho x 88 cm de largo x 47.6 cm de alto) donde se habitaron 14-15 ratones por caja para favorecer la estimulación social. Se ha observado que la presencia de diferentes objetos tiene un efecto mayor en el comportamiento de los ratones (Abou-Ismaïl, 2011; Marashi et al., 2003), por lo que en las cajas de ambiente enriquecido se incluyó una combinación de objetos como túneles de plástico, juguetes de madera y de plástico, cajas y tubos de cartón y envases de vidrio para favorecer la estimulación somatosensorial y cognitiva. El arreglo de las cajas fue cambiado cada semana para mantener la novedad (Figura suplementaria 1). A lo largo del experimento los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12hr:12hr, con agua y alimento ad libitum. Se registro la ganancia de peso de cada ratón y del consumo de alimento por jaula semanalmente. El consumo de alimento se calculó como el total de alimento consumido por cada caja de 5 ratones (AN) o 15 ratones (AE) y representado como el consumo promedio por ratón por semana. Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación por CO₂ a las 18 (para el grupo DAG AE 1M) o a las 26 (para los grupos DN AN, DN AE, DAG AN y DAG AE 3M) semanas experimentales. Al momento del sacrificio se colectó suero y los siguientes tejidos: tejido adiposo epididimal, hígado, músculo, páncreas, hipotálamo y cerebro sin hipotálamo. El tejido fue fijado utilizando paraformaldehído al 4% en PBS 1X y guardado a 4°C, o almacenado a -70°C para su posterior uso. Todos los procedimientos en animales fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología, número de proyecto 300.

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

Las pruebas de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina fueron realizadas en diferentes momentos en nuestras condiciones experimentales para evaluar el efecto de la dieta y de las condiciones habitacionales en el metabolismo de glucosa. A las 11 semanas experimentales se tomaron 20 ratones de cada grupo de dieta (DN y DAG) para ser divididos entra la prueba de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina de manera que el peso promedio fuera similar entre las pruebas para cada dieta (n=10). Después de la separación en condiciones habitacionales las pruebas metabólicas fueron realizadas en la semana 17 para el grupo DAG AE 1M, o en la semana 25 para los otros grupos (DN AN, DN AE, DAG AN y DAG AE 3M). Los ratones fueron puestos en ayuno durante 6 horas previas a la prueba (de las 8:00 a las 14:00 horas). Se midió el valor de glucosa en ayuno antes de las pruebas utilizando un glucómetro y tiras reactivas (Accu-Check Active; Roche). Cada ratón recibió una inyección intraperitoneal de glucosa (1.8gr/kg) para la prueba de tolerancia a la glucosa, o de insulina (1U/kg; Humulin® R, Eli Lilly) para la prueba de resistencia a la insulina. La concentración de glucosa en sangre se midió a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección utilizando un glucómetro y tiras reactivas (Ver apéndice IV).

El área bajo la curva para las pruebas metabólicas fue calculada utilizando la fórmula de Tai (Tai, 1994):

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

Donde X = tiempo (0, 15, 30, 60, 120 min), Y = Glucosa(mg/dL) para cada tiempo

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

El tejido adiposo epididimal congelado fue disociado utilizando tijeras en 400-600 μ l de búfer de lisis (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, β -glicerofosfato 25 mM pH 7.4, PPINa 2 mM, EDTA 2 mM pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glicerol). Las muestras se incubaron en hielo durante 1 hora y se centrifugaron a 14,500 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue colectado y almacenado a -70 °C. La concentración de proteína fue cuantificada utilizando el método BCA.

Para las muestras de hígado e hipotálamo el tejido fue descongelado en 300-500 μ l de buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas (1X complete protease inhibitor cocktail, Roche), Na₃VO₄ (200mM), DTT (0.1mM) y PMSF (1mM). El tejido fue sonicado y el homogenado se incubó en hielo por 10 min. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 14,500 rpm a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C. La concentración de proteína fue cuantificada por el método de Bradford utilizando una curva estándar de BSA.

WESTERN BLOT

Se utilizaron 15-30 μ g de proteína para los ensayos de Western blot. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida (10-15%) y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare Life Sciences). La membrana fue bloqueada en leche o BSA al 5% en TBS-T (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 0.1% Tween) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se dejó incubando a 4°C toda la noche. El anticuerpo secundario fue incubado durante una 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó el sustrato ECL Western Lighting detection reagent (PerkinElmer Inc.) para visualizar las proteínas de interés mediante películas radiográficas (Kodak Films – Medical X-ray General Purpose Blue) o utilizando el equipo C-DiGit 3600 Blot Scanner (LI-COR Biosciences). La densitometría se realizó escaneando las películas utilizando el equipo Gel-Doc™ XR+ (Bio-Rad) y el programa Image Lab (version 6.0.1, Bio-Rad) o utilizando el programa Image Studio Software Versión 5.2.5 (LI-COR Biosciences) para las imágenes adquiridas en el Blot Scanner.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Actina (dilución 1:2000; Santa Cruz sc-1616), anti-beta-Actina (dilución 1:6000, Cell Signaling, CS-3700), anti-AKT fosforilado (p-AKT Ser473, dilución 1:1000; Cell Signaling CS-9271), anti-AKT (dilución 1:3000; Cell Signaling, CS-9272), anti-BDNF (reconoce tanto a proBDNF como BDNF maduro, dilución 1:1000; Santa Cruz sc-546), anti-Foxo1 (dilución 1:1000, Cell Signaling, CS-2880), anti-IKK β (dilución 1:1000; Cell Signaling CS-2370), anti-HSL (dilución 1:1000; Cell Signaling, CS-4107), anti-HSL fosforilado (p-HSL Ser660, dilución 1:1000; Cell Signaling CS-4126), anti-subunidad β del receptor de insulina (IR β , dilución 1:1000; Cell Signaling CS-3020), anti-IRS-1 (dilución 1:1000; Cell Signaling CS-2382), anti-IRS1 fosforilado (p-IRS Ser307, dilución 1:1000; Cell Signaling CS-2381), anti-JNK (dilución 1:2000; Cell Signaling CS-9252), anti-NF- κ B p65 (dilución 1:1000; Cell Signaling CS-4764), anti-Socs3 (dilución 1:1000, Cell Signaling, CS-2923), anti-Stat3 (dilución 1:1000, Cell Signaling, CS-4904) y anti-TRKB (dilución 1:1000; Santa Cruz sc-8316). Se utilizaron anticuerpos

secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP) anti-conejo (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Invitrogen G-21234), anti-conejo (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Cell Signaling, #7074 y anti-ratón (Rabbit anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology SC-2005).

ARREGLO DE CITOCINAS Y QUIMIOCIAS

Para determinar los niveles de marcadores inflamatorios en el tejido adiposo epididimal se utilizaron 250 µg de extractos proteicos totales en un arreglo de anticuerpos (mouse cytokine antibody array C1 RayBio® C-Series #AAM-INF-1-4) usando el protocolo provisto con el kit. Las membranas se adquirieron por quimioluminiscencia en el equipo C-DiGit 3600 Blot Scanner (LI-COR Biosciences). La densitometría se realizó utilizando el software Image Studio Software versión 5.2.5 (LI-COR Biosciences).

ENSAYOS DE ELISA

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardiaca y se dejaron incubando a 4 °C durante dos horas para permitir la coagulación. Las muestras fueron centrifugadas a 1,200 rpm por 10 min, posteriormente se colectó el suero y se almacenó a -70 °C. Se juntó el suero de 3 ratones de cada grupo antes de realizar la medición de los marcadores. Se utilizaron kits de ELISA para cuantificar los niveles de insulina (ALPCO 80-INSMS-E01), leptina (Millipore EZML-82K) y corticosterona (ALPCO 55-CORMS-E01) en suero.

Los niveles de citocinas en el tejido adiposo epididimal se determinaron utilizando extractos proteicos totales y los kits de ELISA (ELISA MAX™ Deluxe Sets Biolegend) para IL-1β (Biolegend, 432605), IL-4 (Biolegend, 431101), IL-6 (Biolegend, 431304), IL-10 (Biolegend, 431414) Y TNF (Biolegend, 430904) siguiendo las instrucciones del proveedor.

HISTOLOGÍA

El procesamiento del tejido adiposo fue realizado en el Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán". El tejido adiposo epididimal (TA) fue colectado y fijado utilizando paraformaldehído al 4% y posteriormente embebido en parafina. Se obtuvieron cortes de 2 µm que fueron puestos en xileno para remover la parafina, rehidratados en diluciones crecientes de etanol y teñidas con hematoxilina y eosina. Se adquirieron imágenes del tejido utilizando un microscopio Nikon Eclipse Ci-L con un objetivo 10x y la cámara Infinity1 Lumenera. El análisis de las imágenes fue realizado en ImageJ (Abràmoff et al., 2004). El infiltrado de células inmunes al tejido adiposo se calculó utilizando 10 campos por rebanada, de 3 rebanadas para cada ratón, utilizando 5 ratones por grupo.

Para los ensayos de inmunohistoquímica en el tejido adiposo se utilizaron cortes de 2 µm que fueron puestos en xileno para remover la parafina y rehidratados en diluciones crecientes de etanol. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica poniendo las laminillas en buffer de recuperación antigénica (100x buffer citrato, ab93678 Abcam) y sumergiendo en agua hirviendo por 25 min. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida utilizando H₂O₂ al 3% en metanol por 20 min. El tejido fue bloqueado

utilizando suero fetal bovino al 1% en PBS 1X pH 7.4 por 30 min. Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios anti-CD163 (dilución 1:100, Invitrogen #14-1631-82) o anti-CD68 (dilución 1:150, Invitrogen #14-0681-82) toda la noche a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario acoplado a HRP (goat anti-rat ab214882, Abcam) fue incubado por 40 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas fueron lavadas 5 veces en PBS 1X pH 7.4 e incubadas con estreptavidina-HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas en 3,3'Diaminobenzidina (DAB ab64238, Abcam) y la reacción fue detenida con agua destilada. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina para dar contraste, lavados en agua destilada por 5 minutos y deshidratados en diluciones de etanol, etanol-xileno y xileno. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Nikon Eclipse Ci-L con un objetivo 20x y la cámara Infinity1 Lumenera. Se utilizó el software Image-Pro Expres versión 6 (Media Cybernetics) para analizar las imágenes. La cuantificación de células CD163+ y CD68+ fue realizada utilizando 10 campos por rebanada, de 3 rebanadas por ratón, utilizando 5 ratones por grupo.

El procesamiento del hígado y las tinciones fueron realizadas en la unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El hígado fue montado en Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) y congelado para ser procesado en cortes de 5 µm. Los cortes de hígado fueron teñidos con hematoxilina y eosina para analizar el tejido. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Zeiss LSM510/UV Axiovert 200M con un objetivo 20x y la cámara Nikon COOLPIX 5000. Se tomaron 10 imágenes por corte, utilizando 3 cortes por ratón, de 3 ratones por grupo.

EXTRACCIÓN DE RNA, TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR TIEMPO REAL

Se extrajo RNA total del tejido adiposo epididimal utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific, 15596026) siguiendo el protocolo provisto por el reactivo con dos modificaciones. Antes de añadir el isopropanol, la muestra en TRIzol fue centrifugada a 13,000 rpms durante un minuto y se descartó la fase superior conteniendo los lípidos. Se agregó un lavado adicional con etanol 100% antes de los lavados con etanol al 70-75%. El RNA fue cuantificado utilizando un Nanodrop 2000 (ThermoFisher). Para la transcripción reversa se utilizaron 500 ng de RNA, oligo dT y hexámeros aleatorios (Thermo Fisher Scientific, N8080127) y la retrotranscriptasa M-MLV (Thermo Fisher Scientific, 28025013).

Para la extracción de RNA de las muestras de hipotálamo se juntaron dos hipotálamos por condición y se realizó la extracción de RNA con un protocolo modificado utilizando Tiocianato de Guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) (ver Apéndice IV). El RNA fue cuantificado utilizando un Nanodrop 2000 (ThermoFisher). Se sintetizó cDNA a partir de 1µg de RNA utilizando oligo dT y la retrotranscriptasa M-MLV (Thermo Fisher Scientific, 28025013).

El cDNA fue diluido 1:10 en agua inyectable antes de realizar las reacciones de PCR. Se utilizó la mezcla de reacción Maxima SYBR Green/ROX 2X qPCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, K0221) y 1 µl del cDNA diluido para las reacciones de PCR tiempo real. Las reacciones de PCR tiempo real se corrieron en el equipo StepOne (Thermo Fisher Scientific, 4376357) a una temperatura de alineamiento de 60°C. La

expresión relativa se calculó normalizando contra *Actina*, *Gapdh* o *Ubc* (basado en la eficiencia de amplificación) usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La siguiente tabla muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR tiempo real:

Gen	Clave del transcrito	Sentido	Antisentido	Amplicón (pb)
<i>Actb</i>	ENSMUST00000100497.10	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	CATCACAATGCCTGTGGTAC	125
<i>Agrp</i>	ENSMUST00000005849.11	CCCAGAGTTCCCAGGTC	CTGTGGATCTAGCACCTCC	112
<i>Cart</i>	ENSMUST00000022150.7	AGAAGAAGTACGGCCAAGTCC	CACACAGCTTCCCGATCC	84
<i>Ccl2</i>	ENSMUST00000000193.6	CTCAGCCAGATGCAGTTAAC	CTACAGCTTCTTTGGGACAC	126
<i>Cd11b</i>	ENSMUST00000064821.14	GCATCAATAGCCAGCCTC	CAACAGCCAGGTCCATC	139
<i>Cidea</i>	ENSMUST00000025404.9	GGAAAAGGGACAGAAATGGAC	CGTGGCTTTGACATTGAGAC	145
<i>Cox7a1</i>	ENSMUST00000098594.3	GGCAGAGAAGCAGAAGCTC	CCAGCCCAAGCAGTATAAGC	142
<i>Crh</i>	ENSMUST00000061294.5	CGCAGCCCTTGAATTTCTTG	GCGGGACTTCTGTTGAGATT	112
<i>Gapdh</i>	ENSMUST00000073605.14	CATTGTGGAAGGGCTCATGA	GGAGGCCATGCCAGTGAGC	193
<i>Il-1b</i>	ENSMUST00000028881.13	CTGAAAGCTCTCCACCTCA	GCCACAGGTATTTTGTCTGTT	101
<i>Il-6</i>	ENSMUST00000026845.11	TGAACAACGATGATGCACTTG	GGTACTCCAGAAGACCAGAG	132
<i>Il-10</i>	ENSMUST00000016673.6	GTGAGAAGCTGAAGACCCTC	ACACCTTGGTCTTGGAGC	124
<i>Il-18</i>	ENSMUST00000059081.13	GACTCTTGCGTCAACTTCAAGG	CAGGCTGTCTTTTGTCAACGA	169
<i>Mgl2</i>	ENSMUST00000041550.12	GCTCTAATTCCTTCCCAGTC	CCTTAACTGGGAATTTTGG	132
<i>Mrc1</i>	ENSMUST00000028045.4	GAACAGACTGCGTGGATTC	CAGCAGTCTCGATGGAAAC	130
<i>Npy</i>	ENSMUST00000031843.7	GGCCAGATACTACTCCGC	CTTCAAGCCTTGTTCTGG	143
<i>Pdk4</i>	ENSMUST00000019721.6	GTCAGGTTATGGGACAGACG	CCTGCTTGGGATACACCAG	142
<i>Pomc</i>	ENSMUST00000020990.7	CTCCTGCTTCAGACCTCC	CAGTCAGGGGCTGTTCAT	169
<i>Prdm16</i>	ENSMUST00000030902.12	AGCTGAGGAAGCATTGAAGT	CGTGGAGAGGAGTGTCTTC	140
<i>Tnf</i>	ENSMUST00000025263.14	GGATGAGAAGTTCCCAATGG	CACTTGGTGGTTTGCTACG	124
<i>Trh</i>	ENSMUST00000006046.5	GTGCCAACCAAGACAAGGAT	TTCTTCCCAGCTTCTTTGGA	227
<i>Ubc</i>	ENSMUST00000027478.7	CCGCCTTCTTCAGTATGCAGA	TGCTTTCGGATATAGCCCTGG	132
<i>Ucp1</i>	ENSMUST00000034146.4	CTCTCTGCCAGGACAGTAC	GCTGTTCAAAGCACACAAAC	149

Las secuencias de los oligonucleótidos para *Cart* fueron obtenidas de (Konieczna et al., 2013), los de *Crh* de (Giannogonas et al., 2016) y los de *Trh* de (Waniek et al., 2015). Los oligonucleótidos para *Ubc* (*Ndufa10*) fueron obtenidos de PrimerBank (ID: 13195623c3)

Para medir la expresión de microRNAs por PCR se tomó 1 µg de RNA de hipotálamo para ser poliadenilado y retrotranscrito utilizando el kit Ncode™ miRNA First-strand cDNA synthesis and qRT-PCR (Invitrogen MIRC-50). Se utilizó la mezcla de reacción Maxima SYBR Green/ROX 2X qPCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, K0221) y 1 µl del cDNA diluido 1:10 en agua. Las reacciones de PCR tiempo real (qPCR) se corrieron en el equipo StepOne (Thermo Fisher Scientific, 4376357). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada microRNA junto con el primer universal provisto en el kit NCode, para el RNA

pequeño U6 se utilizaron oligonucleótidos sentido y antisentido específicos, y se determinó la temperatura de alineamiento para cada reacción. La expresión relativa se calculó normalizando contra el RNA pequeño U6 usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La siguiente tabla muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR tiempo real de microRNAs:

microRNA	Id miRbase / Transcript ID	Oligonucleótido
mmu-miR-9-5p	MIMAT0000142	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA
mmu-miR-96-5p	MIMAT0000541	TTTGGCACTAGCACATTTTGGCT
mmu-miR-151-5p	MIMAT0004536	TCGAGGAGCTCACAGTCT
mmu-miR-182-5p	MIMAT0000211	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG
mmu-miR-206-3p	MIMAT0000239	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG
U6	ENSMUST00000240118.1	S: CTCGCTTCGGCAGCACACA AS: AACGCTTCACGAATTTGCGT

PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS Y SECUENCIACIÓN

La calidad del RNA a utilizar en la secuenciación fue verificada utilizando el equipo Bioanalyzer (Agilent Technologies) donde las muestras tuvieron un número de integridad de RNA (RIN) promedio de 7.4. La fracción correspondiente a los RNAs pequeños fue obtenida mediante selección de tamaño en gel a partir del RNA total de hipotálamo. Las bibliotecas de RNAs pequeños fueron generadas utilizando el Illumina Small RNA Sample Prep Kit (Illumina, FC-102-1009). Las bibliotecas fueron secuenciadas utilizando un secuenciador Illumina GAllx con una configuración de 36 ciclos. La generación de las bibliotecas y secuenciación fue realizada por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología, UNAM.

PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS, ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y BÚSQUEDA DE BLANCOS

Se evaluó la calidad de las secuencias obtenidas utilizando el software FASTQC (Andrews, Simon). Se removieron las secuencias de los adaptadores y aquellas con mala calidad, posteriormente las secuencias filtradas fueron mapeadas contra la base de datos de microRNAs de *Mus musculus* miRbase (Release 21, Kozomara y Griffiths-Jones, 2014) utilizando el programa SMALT v0.7.4 (Ponstingl, Hannes). Se generó una tabla con conteo para cada microRNA encontrado en la base de datos. El análisis de expresión diferencial fue realizado a través del sitio IDEAMEX (Jiménez-Jacinto et al., 2019) utilizando los paquetes de R EdgeR (Robinson et al., 2009), DESeq (Anders y Huber, 2010), y NOISeq (Tarazona et al., 2011). Se consideraron para los análisis subsecuentes aquellos microRNAs que tuvieran un logFC ≥ 1 y un FDR ≤ 0.2 (EdgeR), adj-pval ≤ 0.2 (DESeq), o Prob ≥ 0.8 (NOISeq). Adicionalmente se seleccionaron los microRNAs que fueran identificados como diferencialmente expresados (con los parámetros mencionados) por 2 de los 3 métodos utilizados, obteniendo 41 microRNAs. El mapa de calor de la expresión de los microRNAs se realizó tomando los promedios normalizados para cada condición, los clústeres obtenidos se utilizaron para el análisis de predicción de blancos.

La predicción de blancos para los microRNAs de interés fue realizada usando un meta-análisis de diferentes bases de datos y programas, utilizando los parámetros por defecto (a menos que se especifique un valor): PITA v6 (Kertesz et al., 2007), TargetScan v6.2 (Grimson et al., 2007), DIANA v5 con un corte ≥ 0.9 (Paraskevopoulou et al., 2013), Miranda v3.3 (Enright et al., 2003), Pictar v2 (Krek et al., 2005), mirDB v5 (Wong y Wang, 2015), MirTarBase v4.5 usando solo los registros con evidencia experimental fuerte (interacción directa microRNA-blanco evaluada por ensayo por reportero, Western blot y qPCR) (Hsu et al., 2014), MirWalk v2 (Dweep et al., 2011) y miRecords (Xiao et al., 2009). El procesamiento de las secuencias, análisis de expresión diferencial y búsqueda de blancos para los microRNAs fueron realizados por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología, UNAM.

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS

Para el análisis de enriquecimiento de vías los microRNAs se dividieron en 3 clústeres, dependiendo de su patrón de expresión, para obtener sus posibles blancos. El clúster 1 contiene aquellos microRNAs cuya expresión aumentó en el grupo DAG AN en comparación de los dos grupos DAG AE (DAG AE 1M y DAG AE 3M). El clúster 2 consiste en los microRNAs cuya expresión aumentó en el grupo DAG AE 3M al ser comparado con al menos otros dos grupos. Finalmente, el clúster 3 corresponde a aquellos microRNAs que tenían un aumento en su expresión en el grupo DAG AN y DAG AE 3M y cuya expresión disminuyó en el grupo DAG AE 1M. Para reducir el número de blancos, se decidió utilizar los blancos que fueran compartidos por al menos la mitad de los microRNAs en cada clúster y también se excluyeron los blancos que fueran compartidos por los 3 clústeres. También se excluyeron los blancos de la familia miR-181 dado que el miR-181a-5p forma parte del clúster 2, mientras que el miR-181b-5p se encuentra en el cluster 3. El análisis de enriquecimiento de vías se realizó utilizando el servidor WebGestalt 2017 (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2005) haciendo un análisis de sobrerrepresentación (Overrepresentation Enrichment Analysis) contra la base de datos de la enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG, versión 80.0) (Ogata et al., 1999) utilizando el genoma codificante de proteínas como referencia y un valor de corte FDR ≤ 0.05 .

PLÁSMIDOS

Para la sobreexpresión de los microRNAs de interés se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los pre-miRNAs mmu-miR-9-1 (MI0000720), mmu-miR-96 (MI0000583), mmu-miR-182 (MI0000224), mmu-miR-206 (MI0000249) y mmu-miR-151 (MI0000173) utilizando Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron modificadas para incluir los sitios de restricción BamHI (en el extremo 5') y EcoRI (en el extremo 3') para clonar los productos de PCR en el vector pcDNATM 3.1/myc-His A (pcDNA 3.1) (Invitrogen).

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la 3' UTR de ratón de *Foxo1* (Gene ID: 56458, NM_019739.3) y de *Bdnf* (Gene ID: 12064, diseñados para NM_007540.4) utilizando Primer-BLAST (Ye

et al., 2012). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron modificadas para incluir sitios de restricción de XhoI (en el extremo 5') y de PmeI (en el extremo 3') para clonar los productos de PCR en el vector psiCHECK™-2 (psiCHECK-2) (Promega) río debajo de un gen reportero de luciferasa de *Renilla*. El vector psiCHECK-2 también contiene el gen para la luciferasa de luciérnaga para utilizar como control interno de la eficiencia de transfección. Adicionalmente, se crearon dos versiones mutadas de la 3'UTR de BDNF para los sitios de unión predichos para el miR-182-5p y para el miR-151-5p. Se utilizó el programa PITA v6 (Kertesz et al., 2007) para determinar las mutaciones que abatieran la unión entre los microRNAs deseados y la 3' UTR de *Bdnf*, sin afectar sitios adyacentes. Se utilizó el QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) para generar las mutaciones. El plásmido BDNF-Mut182 se generó realizando una mutación puntual en la secuencia de unión del miR-182-5p (TTGCCAA por CTGCCAA, la mutación realizada se encuentra subrayada) presente en la 3' UTR de *Bdnf* que fue clonada. El plásmido BDNF-Mut151 se generó mutando 2 nucleótidos en el sitio de unión del miR-151-5p (TCCTCGA por TCCTACA, la mutación realizada se encuentra subrayada) presente en la 3' UTR de *Bdnf* que fue clonada.

Para todos los plásmidos se extrajo DNA de al menos tres colonias, se checó el patrón de restricción esperado y se verificó que la secuencia fuera correcta mediante pirosecuenciación realizada en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los mapas de los plásmidos al igual que la secuencia clonada se encuentran en el Apéndice III.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para realizar las construcciones descritas:

Blanco	Oligonucleótidos	Número de Acceso
3' UTR <i>Foxo1</i>	Fwd: ATTGCTCGAGAGCAGGA ^{ACT} GAGGAGC Rev: CAGTGT ^{TTAA} ACCGAGGTGCAGGACAGAGA	Gene ID: 56458 NM_019739.3
3' UTR <i>Bdnf</i>	Fwd: GCAACTCGAGAATTGGCTGGCGATTCATAA Rev: GGGAG ^{TTAA} ACATGGGCAGTGGAGTGTG	Gene ID: 12064 NM_007540.4
BDNF_mut182	Fwd: TTGTTTTCAATTCTTGGCAGCGGCAACA ^{ACC} CACAACAT Rev: ATGTTGTGGTTTGTGCGCTGCCAAGAATTGAAAACAA	
BDNF_mut151	Fwd: AACAAACCACAACATTATGTAGGAATGTAATGCAGAC Rev: AGTCTGCATTACATTCCTACATAATGTTGTGGTTTGT	
mmu-miR-9-1	Fwd: TCCTGGATCCCATCTTTTCGCCTCCACA Rev: AGGCGAATTCAGAGCGGCTTCTTGCTT	MI0000720
mmu-miR-96	Fwd: AGACGGATCCGCGAGCACCTTGG Rev: CTGGGAATTCACCAGGGTAGGGCTGTACC	MI0000583
mmu-miR-182	Fwd: AGCGGGATCCTAAAACCACCCTAACTG Rev: CCGAGAATTCGTCGACTTCATGACTTGTGA	MI0000224
mmu-miR-206	Fwd: AGATGGATCCTTACTCCAGGATAGTTTCTG Rev: ACCTGAATTCAGTATTGTGGGAGAAGT	MI0000224
mmu-miR-151	Fwd: AGCAGGATCCTCCATTTTTCTTGGCTT Rev: TGGTGAATTC ^{CAACT} CCACTGCAGTCTC	MI0000173

LÍNEAS CELULARES Y TRANSFECCIONES

Se utilizaron las líneas celulares de riñón humano embrionario HEK-293 (ATCC) y de neuronas embrionarias hipotalámicas de ratón mHypoE-N1 (CELLutions BIOSYSTEMS) para los ensayos de

transfección donde se probó la interacción microRNA-blanco. Se sembraron 2×10^5 células en cajas de cultivo de 35 mm y se dejaron alcanzar una confluencia de 80-95%. Se transfectaron 100 ng del vector psiCHECK-2 vacío o con las construcciones del vector psiCHECK-2 con las 3' UTRs de interés (UTR) junto con 200 ng del vector pcDNA 3.1 vacío o con las construcciones para sobre expresar los microRNAs en el vector pcDNA 3.1 (miR) utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668019). Se determinó la actividad de luciferasa utilizando el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System Kit (Promega, E1980) 48 horas después de la transfección. Las unidades relativas de luciferasa se determinaron como la razón de la actividad de la luciferasa de Renilla/Luciernaga para cada muestra. Se calcularon las unidades relativas de luciferasa de los microRNAs normalizado contra el vector pcDNA vacío para cada UTR, y se normalizó utilizando el vector psiCHECK vacío usando la formula:
$$\frac{\text{UTR_miR} / \text{UTR_pcDNA}}{\text{psiCHECK_miR/psiCHECK_pcDNA}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos en las gráficas representan la media \pm error estándar. Se utilizó una prueba t de student para realizar las comparaciones pareadas. Se realizaron ANOVA de una vía con una prueba de Tukey's, y ANOVA de dos-vías con una prueba Tukey para las comparaciones múltiples o una prueba Bonferroni para las comparaciones pareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad software).

RESULTADOS

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REESTABLECE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA

Se utilizó un modelo de obesidad inducida por dieta alimentando a los ratones con una dieta alta en grasa (DAG) para determinar si el AE tiene efectos benéficos en ratones que presentan alteraciones metabólicas. Se utilizaron 75 ratones C57BL/6N los cuales fueron divididos para ser alimentados con una dieta normal (DN n=30) como control, o una DAG (n=45) donde el 60% de las calorías que provee el alimento provienen de grasas. Los ratones fueron mantenidos en condiciones habitacionales control durante 13 semanas llevando un registro de la ingesta y de la ganancia de peso semanalmente. Observamos que los ratones alimentados con una DAG presentaron una ganancia significativa de peso (Figura 2A) y tuvieron un mayor consumo de calorías (Figura 2B-C) semanal al ser comparados con los ratones alimentados con una DN.

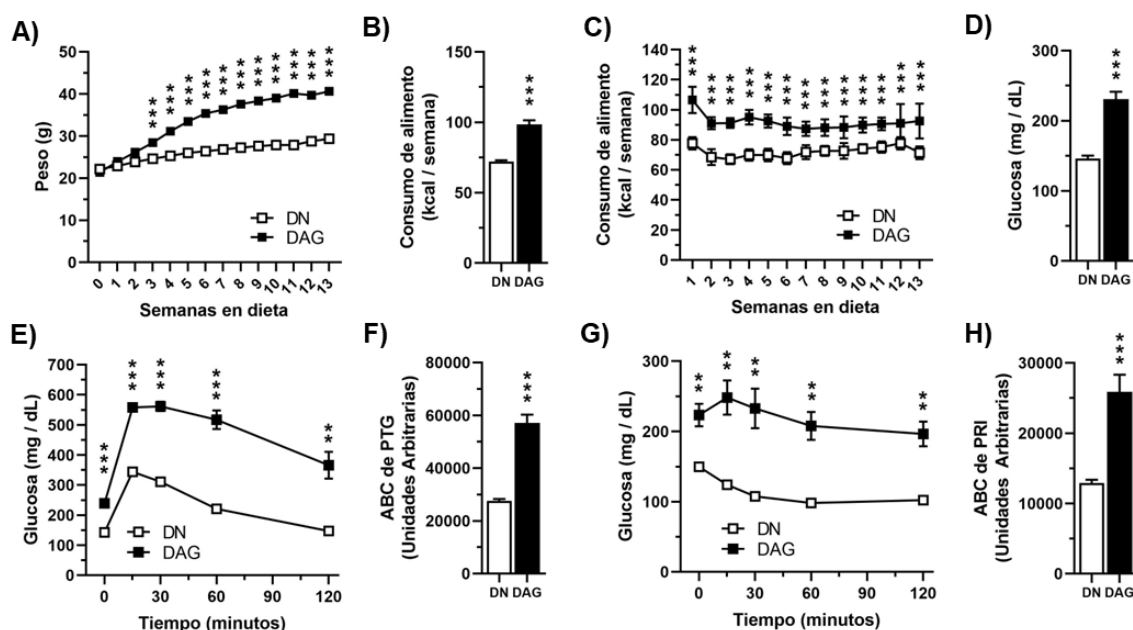


Figura 2 - La administración de una dieta alta en grasa lleva a una ganancia de peso y alteraciones metabólicas

Ratones C57BL/6N fueron divididos para ser alimentados con una DN (n=30) o una DAG (n=44) por 13 semanas en condiciones habitacionales control. **A)** Peso semanal promedio por grupo. **B)** Consumo promedio de alimento a la semana durante 13 semanas. **C)** Consumo semanal de alimento por grupo. **D)** Niveles de glucosa en sangre posterior a 6 horas de ayuno en ratones alimentados con una DN o una DAG por 11 semanas (n=20). **E)** Valores de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa realizada a las 11 semanas de dieta (n=10). **F)** Área bajo la curva para la prueba de tolerancia a la glucosa. **G)** Valores de glucosa en sangre durante la prueba de resistencia a la insulina realizada a las 11 semanas de dieta (n=10). **H)** Área bajo la curva para la prueba de resistencia a la insulina. Las gráficas representan la media \pm el error estándar. ** P<0.01, *** P<0.001, * vs DN

Adicionalmente, observamos que los ratones alimentados con una DAG tenían valores elevados de glucosa en sangre después de un ayuno de 6 horas (Figura 2D), además de que generaron intolerancia a la glucosa (Figura 2E-F) y resistencia a la insulina (Figura 2G-H) después de 12 semanas de ser alimentados con la DAG. En conjunto estos resultados validan el modelo de obesidad inducida por dieta en ratones, como ha sido reportado en otros estudios (Strissel et al., 2007).

Una vez que validamos que los ratones alimentados con una DAG presentaban alteraciones en el metabolismo de glucosa, dividimos a los ratones para ser mantenidos en condiciones de ambiente normal (AN) o para ser habitados en un ambiente enriquecido (AE) por 12 semanas adicionales, manteniendo la misma dieta que habían tenido previamente. Para las condiciones de AE, los ratones fueron cambiados a una jaula de mayor tamaño donde se cohabitaron 15 ratones, se incluyeron diferentes juguetes y objetos cuyo arreglo fue modificado cada semana. De esta manera, se formaron los 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) (Figura 3A). Para determinar si la exposición al AE ejerce un efecto tiempo dependiente se formaron dos grupos de DAG AE: un grupo se mantuvo en el AE solamente por 5 semanas adicionales (DAG AE 1M) (17 semanas en total), mientras que el otro grupo se mantuvo en el AE por 12 semanas adicionales (DAG AE 3M) al igual que el resto de los grupos (25 semanas en total) (Figura 3A). Se continuó llevando un registro del peso y consumo de alimento de los ratones semanalmente hasta su eutanasia.

Comparando los grupos de ratones alimentados con una DN entre los ambientes no observamos diferencias en la ganancia de peso a lo largo de las semanas (Figura 3B), ni en el peso al final del experimento (Figura 3C). Así mismo, observamos que los dos grupos de ratones alimentados con una DN presentaron un consumo similar de calorías a la semana aún después de la división en diferentes ambientes (Figura 3D-E). En cuanto a los ratones alimentados con una DAG, observamos que los ratones mantenidos en un AN continuaron ganando peso a lo largo del experimento (Figura 3B). Cuando los ratones alimentados con una DAG fueron cambiados al AE observamos una pérdida inicial de peso, sin embargo, al paso de las semanas los ratones volvieron a ganar peso hasta alcanzar al grupo DAG AN (Figura 3B). Por lo que, al momento de la eutanasia los ratones el grupo DAG AE 1M presentaron un peso similar a los grupos alimentados con una DN, mientras que el grupo DAG AE 3M presentó un peso similar al grupo DAG AN (Figura 3C). Adicionalmente, observamos que los ratones DAG mantenidos en el AN presentaron un consumo de alimento estable a lo largo de las semanas (Figura 3D), mientras que los ratones que fueron habitados en el AE presentaron una disminución en el consumo de alimento en las primeras semanas después del cambio de ambiente (Figura 3D), lo cual correlaciona con la pérdida de peso observada en estos ratones (Figura 3B). Al medir el consumo promedio de calorías a la semana observamos que ambos grupos de ratones DAG AE presentaron una disminución en la ingesta al comparar con el grupo DAG AN (Figura 3E), aunque el grupo que estuvo 3 meses en el AE tuvo un consumo promedio de alimento mayor al del grupo DAG AE 1M (Figura 3E).

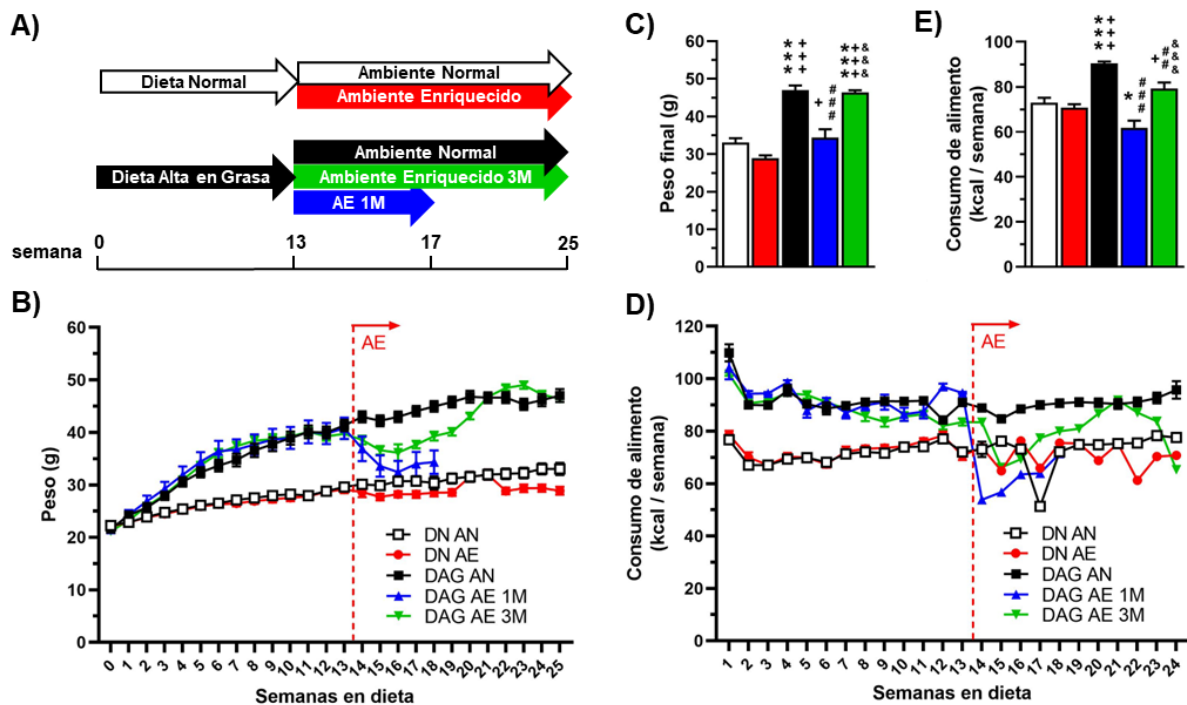


Figura 3 - El ambiente enriquecido disminuye el consumo de alimento y lleva a una disminución en la ganancia de peso transitoria en ratones alimentados con una dieta alta en grasa

A) Diseño experimental. **B)** Peso promedio semanal durante el experimento, la línea punteada roja indica la semana (13) en la que se realizó el cambio de ambiente (n=14-15). **C)** Peso al final del experimento (grupo DAG AE 1M: semana 18; grupos DN AN, DN AE, DAG AN y DAG AE 3M: semana 25). **D)** Consumo de alimento promedio a la semana de los diferentes grupos, la línea punteada roja indica la semana (13) en la que se realizó el cambio de ambiente (n=14-15) **E)** Consumo de alimento semanal promedio. Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, + vs DN AE, # vs DAG AN, & vs DAG AE 1M y % vs DAG AE 3M.

Para continuar caracterizando el efecto de la dieta y el ambiente en los ratones bajo nuestras condiciones experimentales, decidimos determinar los niveles de diferentes hormonas y metabolitos en circulación. Al medir los niveles de leptina (Figura 4A), corticosterona (Figura 4B) e insulina en suero (Figura 4D), o glucosa en sangre (Figura 4C), no observamos diferencias entre los ratones que fueron alimentados con una DN en las diferentes condiciones habitacionales. En el caso de los ratones alimentados con una DAG, observamos niveles elevados de leptina en el suero de los ratones del grupo DAG AN y DAG AE 3M con respecto a los ratones alimentados con una DN (Figura 4A), lo que concuerda con la ganancia de peso que presentaban estos ratones al final del experimento (Figura 3C). Con respecto a los niveles de corticosterona en suero, observamos una tendencia a incrementar en los animales expuestos al AE o en respuesta a la alimentación con una DAG (Figura 4B), sin embargo, solo observamos un aumento significativo en los ratones del grupo DAG AE 3M con respecto a los ratones DN AN (Figura 4B). Adicionalmente, detectamos niveles de glucosa en sangre elevados en los ratones DAG AN con respecto a los ratones alimentados con una DN (Figura 4C). De forma interesante, observamos que ambos grupos de ratones alimentados con una DAG presentaron una disminución en los niveles de glucosa en sangre después de 1 y 3 meses de ser habitados en un AE (Figura 4C). De igual forma, determinamos que la

administración de una DAG en condiciones control aumentó los niveles de insulina en suero (Figura 4D). Aunque no hubo una diferencia significativa, observamos una tendencia en que los niveles de insulina en suero estuvieran disminuidos en ambos grupos de ratones habitados en un AE por 3 meses (DN AE y DAG AE 3M) con respecto a su condición control.

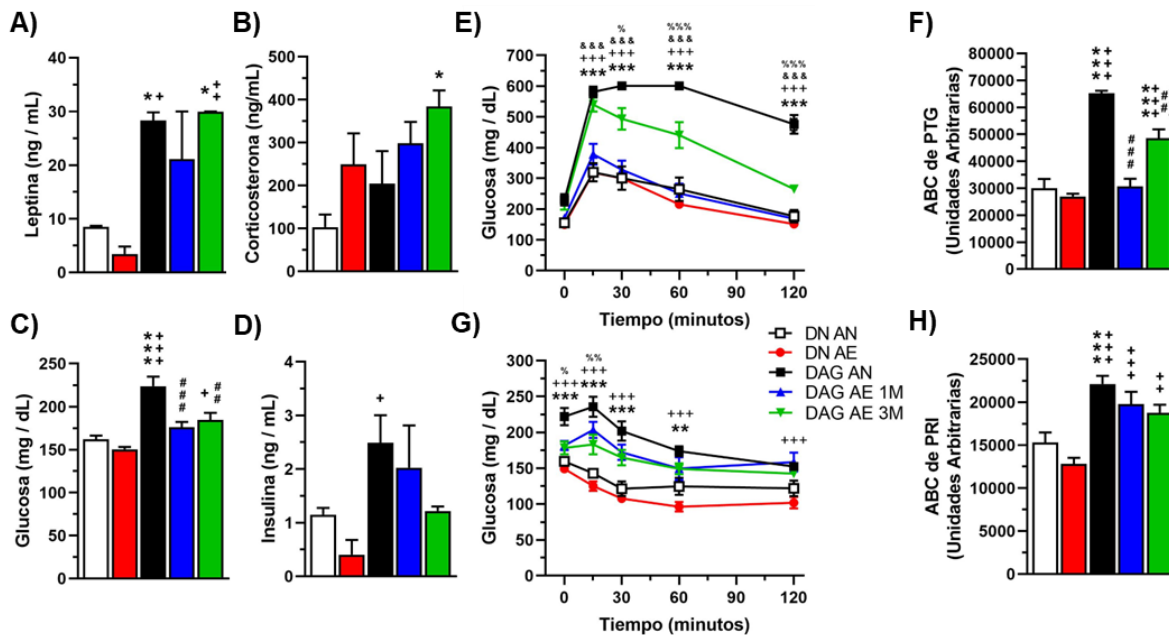


Figura 4 – El ambiente enriquecido mejora el metabolismo de la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

Niveles de leptina (A), corticosterona (B) e insulina (D) en suero medidos por ELISA después del sacrificio de los ratones. C) Niveles de glucosa en sangre en ayuno (n=10). E) Niveles de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa (n=5). F) Área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa (n=5). G) Niveles de glucosa en sangre durante la prueba de resistencia a la insulina (n=5-10). H) Área bajo la curva de la prueba de resistencia a la insulina (n=5-10). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, + vs DN AE, # vs DAG AN, & vs DAG AE 1M y % vs DAG AE 3M. En E y G solo se muestra la comparación contra el grupo DAG AN.

Al realizar nuevamente la prueba de tolerancia a la glucosa observamos que ambos grupos de ratones alimentados con una DN continuaban presentando una respuesta correcta ante una inyección intraperitoneal de glucosa, con un aumento en los niveles de glucosa a los 15 minutos después de la inyección y un regreso a los niveles basales después de 2 horas (Figura 4E). Mientras que los ratones del grupo DAG AN mostraron intolerancia a la glucosa ya que presentaron valores elevados de glucosa en sangre en todos los puntos de la prueba (Figura 4E) y un aumento en el área bajo la curva (Figura 4F). Adicionalmente, observamos que los ratones del grupo DAG AE 1M presentaron un comportamiento muy similar a los ratones alimentados con una DN durante la prueba (Figura 4E), lo cual también se observó al calcular el área bajo la curva (Figura 4F). Aunque no habíamos observado una diferencia en el peso final entre los grupos DAG AN y DAG AE 3M (Figura 3C), en la prueba de tolerancia a la glucosa observamos que los ratones que fueron habitados en el AE por 3 meses presentaron un incremento en los niveles de glucosa en sangre en los primeros 15 minutos de la prueba, pero después de 2 horas los niveles de glucosa

en sangre regresaron a los niveles basales (Figura 4E). Al realizar el cálculo del área bajo la curva para la prueba de tolerancia a la glucosa del grupo DAG AE 3M observamos que, aunque el área es mayor a la de los grupos alimentados con una DN, es significativamente menor a la de los ratones DAG AN (Figura 4F), lo cual indica que estos ratones tienen una mejor tolerancia a la glucosa que el grupo DAG AN.

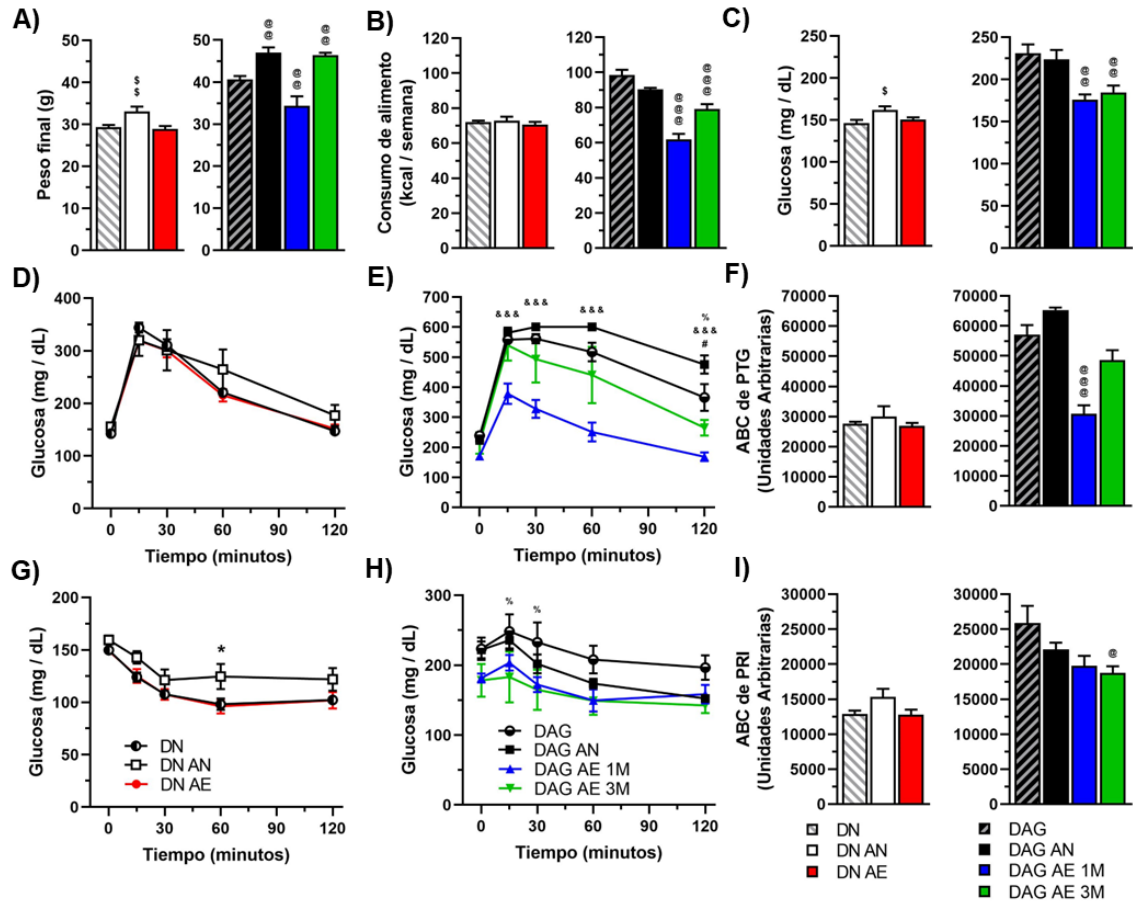


Figura 5 - Comparación de peso, consumo y metabolismo de los ratones antes y después del cambio en ambiente por dieta

Se compararon los valores de peso, consumo de alimento, glucosa en sangre y respuesta en las pruebas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en los ratones alimentados con una DN o DAG antes de la división en ambientes (semana 11-13) y al final del experimento (grupo DAG AE 1M: semana 18; grupos DN AN, DN AE, DAG AN y DAG AE 3M: semana 25).

A) Peso final. **B)** Consumo de alimento semanal promedio. **C)** Niveles de glucosa en sangre en ayuno. **(D-E)** Niveles de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa. **F)** Área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa. **(G-H)** Niveles de glucosa en sangre durante la prueba de resistencia a la insulina (n=5-10). **I)** Área bajo la curva de la prueba de resistencia a la insulina

Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, \$ vs DN, @ vs DAG, & vs DAG AE 1M y % vs DAG AE 3M. Para **A**, **B**, **C**, **F** e **I**, la comparación se hizo solamente entre grupos de ratones con la misma dieta contra los valores obtenidos antes de la división de ambientes. Para **D-E**, **G-H** solo se muestra la comparación contra DN o DAG.

En la prueba de resistencia a la insulina observamos una disminución en los niveles de glucosa en sangre en ambos grupos de ratones alimentados con una DN (Figura 4G), mostrando sensibilidad a la insulina. Al igual que en la prueba de tolerancia a la glucosa, los ratones del grupo DAG AN presentaron valores de

glucosa elevados en todos los puntos de la prueba al ser comparados con los ratones DN AN o DN AE (Figura 4G), lo cual también se observa en el cálculo del área bajo la curva para la prueba de resistencia a la insulina (Figura 4H). En cuanto a los ratones alimentados con una DAG y habitados en un AE no observamos una disminución en el área bajo la curva en la prueba de resistencia a la insulina (Figura 4H). Sin embargo, observamos que los ratones del grupo DAG AE 3M presentaron valores disminuidos de glucosa en sangre en los primeros dos puntos de la prueba (0 y 15 minutos) al comparar con los ratones DAG AN (Figura 4G), lo cual sugiere una mayor sensibilidad a la insulina en este grupo.

Comparando los resultados que se obtuvieron antes de la división en ambientes con los resultados obtenidos al final del experimento, observamos que los ratones alimentados con una DN mantenidos en un AN tuvieron un ligero aumento de peso (Figura 5A), así como un aumento en los niveles de glucosa en sangre (Figura 5C) después de las 12 semanas adicionales. Este aumento en el peso y en la glucosa en sangre no se observó en los ratones DN AE. Adicionalmente, observamos que después de 25 semanas los ratones DN AN tuvieron una menor disminución en los niveles de glucosa en sangre al ser inyectados con insulina al ser comparados con los datos de los ratones DN a las 11 semanas (Figura 5G). Estudios anteriores han demostrado que los ratones de la cepa C57BL/6 aumentan de peso y desarrollan resistencia a la insulina con la edad (Collins et al., 2004). Estos resultados sugieren que el AE evita el desarrollo de resistencia a la insulina durante el envejecimiento. En cuanto a los animales alimentados con una DAG, observamos que los ratones del grupo DAG AN y DAG AE 3M mostraron un peso final mayor al que presentaban a las 12 semanas (Figura 5A), mientras que los ratones del grupo DAG AE 1M disminuyeron de peso. Ambos grupos de ratones DAG AE también presentaron una disminución en la ingesta y en los niveles de glucosa en sangre en comparación a los valores que presentaban los ratones después de ser alimentados 12 semanas con una DAG (Figura 5B-C). En las pruebas metabólicas observamos que los ratones que estuvieron un mes en el ambiente enriquecido presentaron una mayor tolerancia a la glucosa al ser comparados con el grupo DAG antes del cambio de ambiente (Figura 5E-F). Mientras que en la prueba de resistencia a la insulina observamos diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre a los 15 y 30 minutos de la prueba y en el área bajo la curva de los ratones DAG AE 3M al ser comparados con los valores obtenidos en el grupo DAG a las 11 semanas (Figura 5H-I). En conjunto estos resultados muestran que el AE reduce las alteraciones metabólicas en un modelo de obesidad inducida por dieta en ratones, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre, aumentando la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO AUMENTA LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA Y DISMINUYE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN EL HÍGADO

Para continuar estudiando el efecto del AE en la sensibilidad a la insulina, decidimos determinar el estado de activación de la vía de señalización de la insulina en el hígado (Figura 6A). Estudios previos han determinado que la administración de una DAG lleva a la inhibición de la señalización de la insulina en diferentes tejidos donde se observa una reducción en la fosforilación de AKT (Sabio et al., 2008).

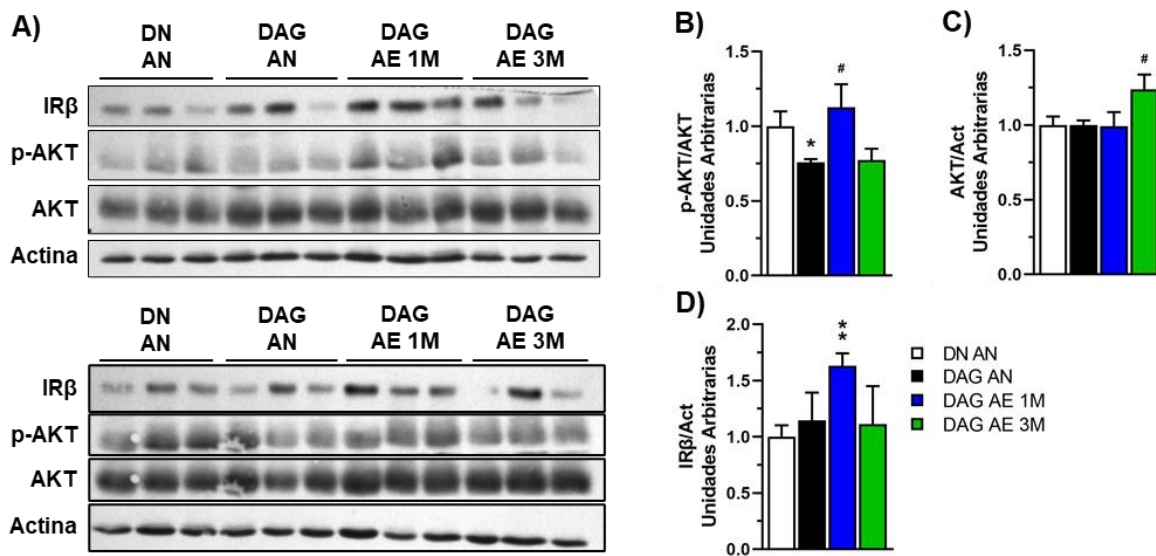


Figura 6 - El ambiente enriquecido aumenta la señalización de insulina en el hígado en ratones alimentados con una dieta alta en grasa

A) Western Blot mostrando los niveles de proteínas de la vía de señalización de insulina. Niveles proteicos de AKT fosforilado en la serina 473 (p-AKT) (**B**), de AKT total (**C**) y de la subunidad beta del receptor de insulina (IRβ) (**D**) en el hígado determinados por Western Blot (n=6). Las gráficas representan la media ± el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

Bajo nuestras condiciones experimentales, observamos niveles reducidos de AKT fosforilado en la serina 473 (p-AKT) en el hígado de los ratones del grupo DAG AN (Figura 6B). Sin embargo, observamos que los niveles de p-AKT en el hígado no se encontraban disminuidos en los ratones que expuestos al AE por 1 mes aunque fueron alimentados con una DAG (Figura 6B). En cuanto a los niveles de AKT total solo observamos un aumento en los niveles de esta proteína en los ratones DAG AE 3M al comparar con los ratones DAG AN (Figura 6C). Adicionalmente, observamos un aumento en la subunidad beta del receptor de insulina (IRβ) en los ratones DAG AE 1M (Figura 6C), lo cual correlaciona con los niveles de p-AKT observado en este grupo. Estos resultados sugieren que el AE mantiene la señalización de insulina en el hígado en ratones alimentados con una DAG, aunque este efecto no se observa a largo plazo.

Estudios previos han determinado que la alimentación con una DAG promueve la acumulación de lípidos en el hígado, llevando al desarrollo de esteatosis hepática (Koyama y Brenner, 2017). Dado esto, realizamos un análisis histológico en cortes de hígado mediante la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). No observamos diferencias en la acumulación de lípidos en el hígado de los ratones de ambos grupos alimentados con una DN (Figura 7). Confirmamos que los ratones del grupo DAG AN presentan una mayor cantidad de lípidos en el hígado, mientras que se observó una reducción en la esteatosis hepática en los ratones que estuvieron 3 meses en el AE (Figura 7). Estos datos nos indican que el AE disminuye la esteatosis hepática aún en ratones alimentados con una DAG.

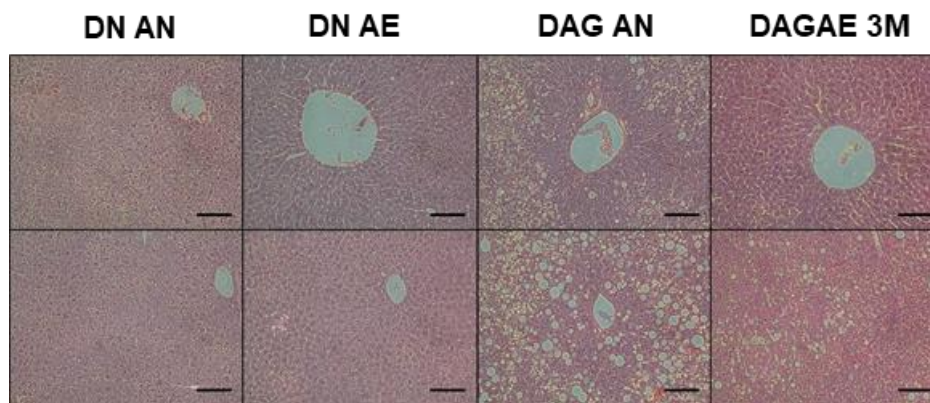


Figura 7 - El ambiente enriquecido disminuye la acumulación de lípidos en el hígado en ratones alimentados con una dieta alta en grasa

Fotos representativas de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en cortes de hígado, la barra de escala equivale a 100 μm .

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO DISMINUYE LA INFLAMACIÓN EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA

La obesidad induce un proceso inflamatorio en el tejido adiposo el cual se caracteriza por la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias que conlleva al reclutamiento y activación de diferentes células del sistema inmune a este tejido (Reilly y Saltiel, 2017). En nuestro modelo de obesidad inducida por dieta validamos que los ratones alimentados con una DAG mantenidos en un AN presentaron un aumento en el número de células infiltradas y en el área de infiltración en el tejido adiposo epididimal (Figura 8A-C). De forma interesante, encontramos que el área y número de células infiltradas al tejido adiposo era menor en los ratones alimentados con una DAG expuestos al AE (Figura 8A-C). Con el propósito de caracterizar el infiltrado celular, realizamos inmunotinciones para los marcadores de macrófagos CD68 y CD163 (Barros et al., 2013). Confirmamos que los ratones del grupo DAG AN presentaban un mayor reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo al compararlos con los ratones alimentados con una DN (Figura 8D-E). Adicionalmente, observamos una disminución en el número de células CD163+ en el tejido adiposo en ambos grupos de ratones DAG AE (Figura 8D), también observamos una disminución en el número de células CD68+ aunque esta diferencia no fue significativa (Figura 8E).

Para continuar caracterizando el efecto del AE en el estado inflamatorio del tejido adiposo, utilizamos un arreglo de anticuerpos para determinar los niveles de citocinas y quimiocinas en este tejido (Figura 9, Tabla suplementaria 1). Observamos que la administración de una DAG aumenta los niveles de diferentes marcadores inflamatorios (entre ellos leptina, TNF, TNFRI, TNFRII, FASL, IL-2, IL-9, IL-12 p70, CCL2, CCL3, CCL9, CCL11, CCL24, CXCL1, CX3CL1, G-CSF, M-CSF, y CD30L) en el tejido adiposo epididimal (Figura 9). Aunque los ratones continuaran siendo alimentados con una DAG, observamos que el AE disminuyó los niveles de diferentes citocinas y quimiocinas en el tejido adiposo, entre ellas leptina, CCL2, CCL9, CCL11, CCL24, IL-2, IL-6, IL-12 p70, TNF, FASL, G-CSF y M-CSF (Figura 9).

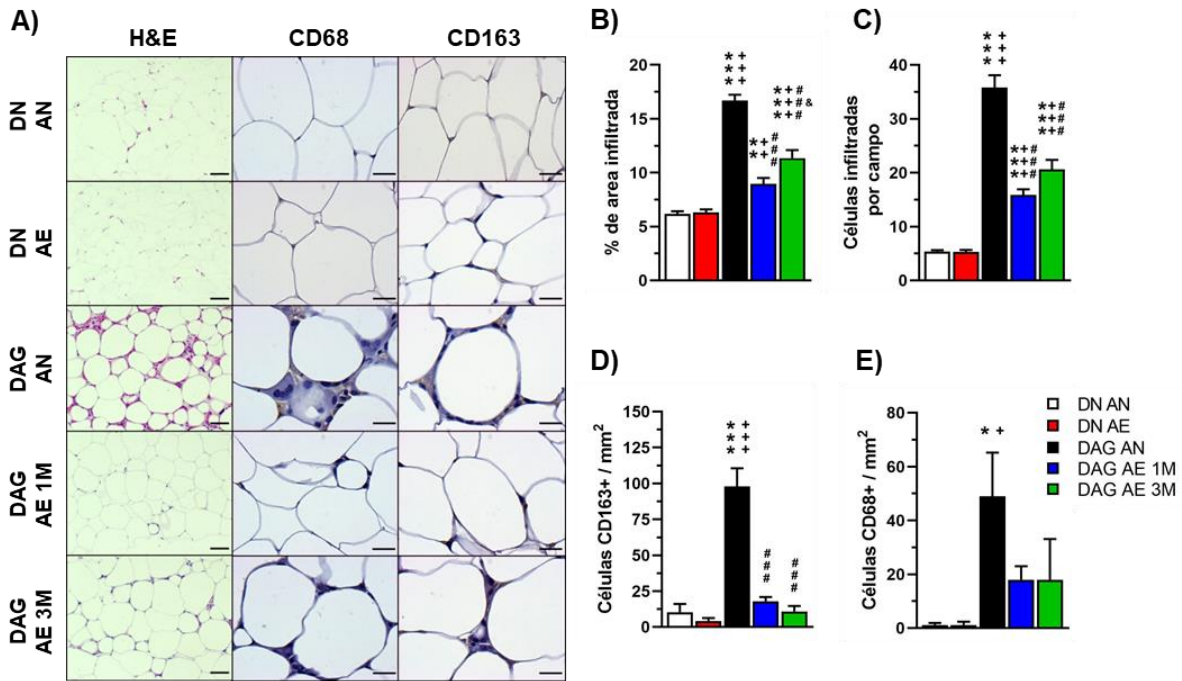


Figura 8 - El ambiente enriquecido disminuye la infiltración de células inmunes al tejido adiposo en ratones alimentados con una dieta alta en grasa

A) Fotos representativas de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y de inmunohistoquímica para CD68 y CD163 en tejido adiposo epididimal. Las barras de escala representan 200 μ m para H&E y 50 μ m para CD68 y CD163. Porcentaje de área infiltrada (**B**) y número de células infiltradas por campo (**C**) en el tejido adiposo determinado por H&E (n=5). Número de células CD68+ (**D**) o CD163+ (**E**) determinadas por inmunohistoquímica (n=5). Las gráficas representan la media \pm el error estándar.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, + vs DN AE, # vs DAG AN, y & vs DAG AE 1M.

Para validar los resultados del arreglo de anticuerpos medimos los niveles de diferentes citocinas (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, e *Il10*) y quimiocinas (*Ccl2*) en el tejido adiposo por PCR en tiempo real (qPCR) (Figura 10). Al contrario de lo observado en el arreglo de anticuerpos, no observamos diferencias en los niveles de RNA mensajero de *Tnf* (Figura 10A), *Il1b* (Figura 10B), *Il6* (Figura 10C), *Il10* (Figura 10D), ni *Ccl2* (Figura 10E) en el tejido adiposo epididimal de los diferentes grupos. Adicionalmente, también medimos los niveles de los marcadores de macrófagos *Cd11b*, *Mgl2* y *Mrc1* por qPCR. *Cd11b* es un marcador general de macrófagos, mientras que *Mgl2* y *Mrc1* son expresados por macrófagos M2 con funciones antiinflamatorias (Hill et al., 2014). No encontramos diferencias significativas entre los grupos al medir los niveles de *Cd11b* (Figura 10F) o *Mrc1* (Figura 10H), pero observamos una disminución significativa en los niveles de *Mgl2* en el tejido adiposo de los ratones DAG AN al comparar con los ratones DN AN (Figura 10G).

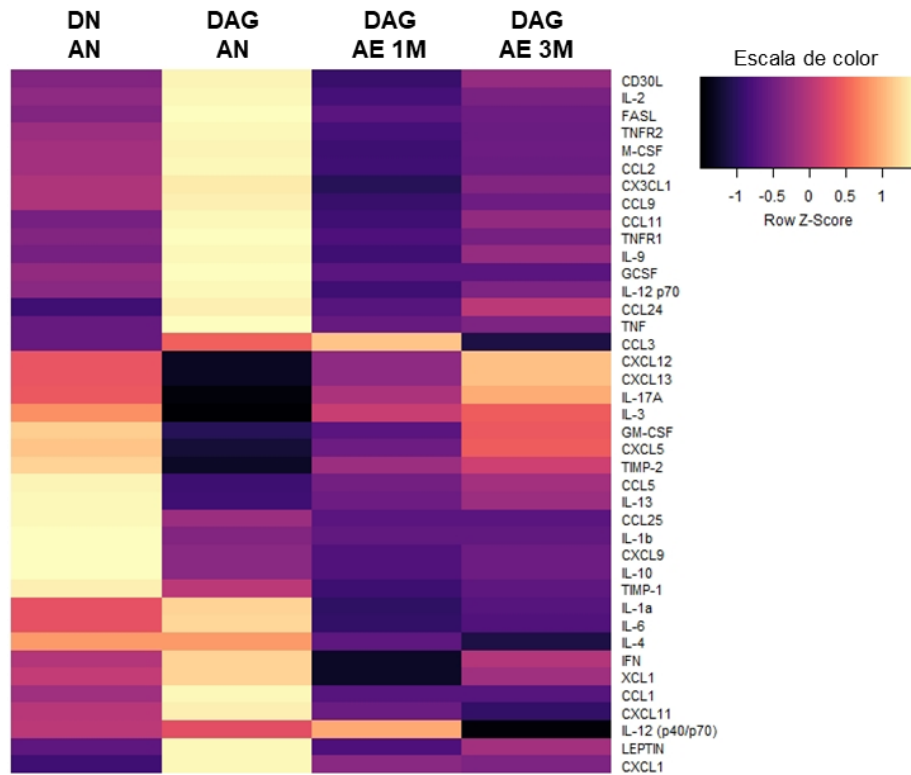


Figura 9 - El ambiente enriquecido disminuye los niveles de diferentes marcadores inflamatorios aumentados por una dieta alta en grasa en el tejido adiposo

Mapa de calor representando los niveles proteicos de diferentes marcadores inflamatorios que fueron determinados utilizando un arreglo de anticuerpos (n=1).

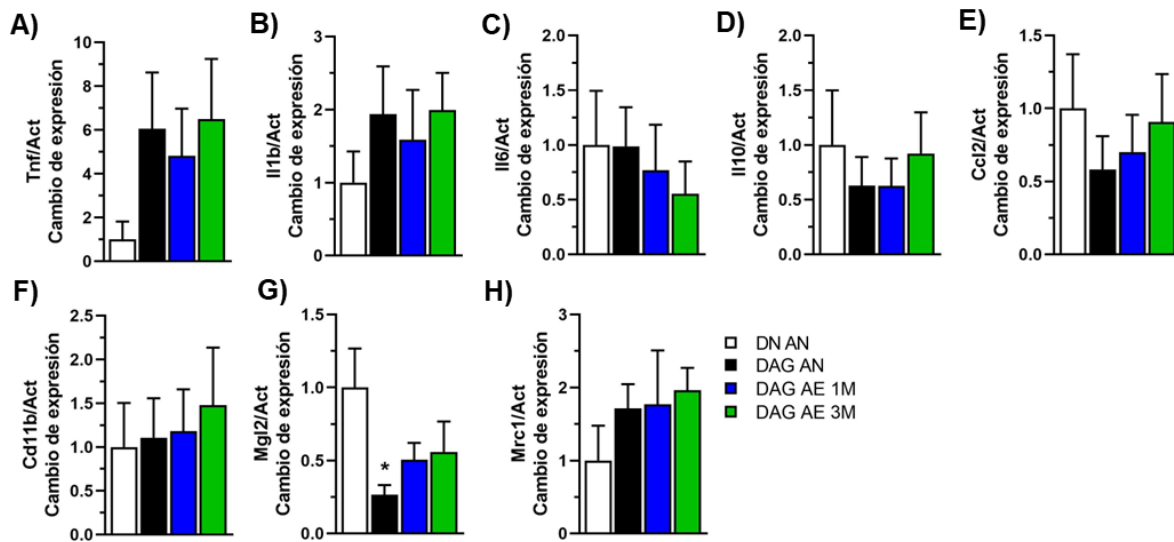


Figura 10 - El ambiente enriquecido no altera la expresión de diferentes marcadores inflamatorios en el tejido adiposo

Expresión del RNA mensajero de *Tnf* (A), *Il1b* (B), *Il6* (C), *Il10* (D), *Ccl2* (E), *Cd11b* (F), *Mgl2* (G) y *Mrc1* (H) en el tejido adiposo epididimal determinados por PCR tiempo real (n=5). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN, y & vs DAG AE 1M.

Dado que no observamos diferencias significativas en el nivel de expresión de los RNAs mensajeros de las diferentes citocinas, decidimos evaluar sus niveles proteicos por ELISA en el tejido adiposo de nuestros grupos experimentales (Figura 11). A diferencia de los valores obtenidos por qPCR, observamos que los ratones DAG AN presentaron valores elevados de las citocinas proinflamatorias TNF, IL-1 β e IL-6 en el tejido adiposo al comparar con los ratones DN AN (Figura 11A-C). De forma interesante, observamos que los ratones DAG AE 1M presentaban valores similares de TNF, IL-1 β e IL-6 a los ratones alimentados con una DN (Figura 11A-C). Mientras que en el grupo DAG AE 3M observamos la disminución de TNF al comparar con los ratones DAG AN (Figura 11A). Con estos resultados decidimos también medir los niveles de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-4, donde observamos que los ratones DAG AN presentaron una disminución en los niveles de IL-10 y una tendencia a una disminución en los niveles de IL-4 en el tejido adiposo (Figura 11D-E). Adicionalmente, el AE aumentó los niveles de IL-10 en el tejido adiposo de ratones alimentados con una DAG comparado con los niveles obtenidos en los ratones DAG AN y DN AN (Figura 11D). En el caso de IL-4, observamos que el AE aumentó los niveles de esta citocina en el tejido adiposo, aunque este aumento solo fue significativo en los ratones DAG AE 3M con respecto a los ratones DAG AN (Figura 11E). En conjunto estos datos nos indican que el AE disminuye el reclutamiento de células del sistema inmune y la inflamación en el tejido adiposo en ratones alimentados con una DAG y sugiere que el AE pudiera favorecer un estado antiinflamatorio en este tejido.

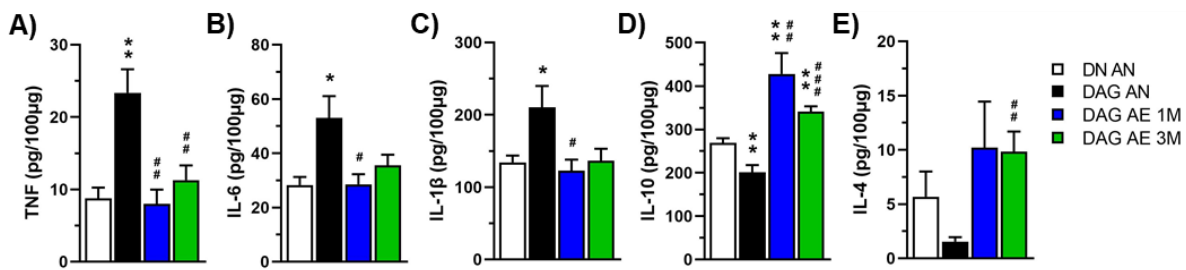


Figura 11 - El ambiente enriquecido disminuye la expresión de citocinas inflamatorias y aumenta la expresión de citocinas anti-inflamatorias en el tejido adiposo de ratones alimentados con una DAG
Niveles proteicos de TNF (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), IL-10 (D) e IL-4 (E) en el tejido adiposo epididimal determinados por ELISA (n=5). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN, y & vs DAG AE 1M.

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO AUMENTA LOS NIVELES DE MARCADORES DE LIPÓLISIS Y DE TEJIDO ADIPOSEO PARDO EN EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO

El tejido adiposo blanco sirve como el principal reservorio de lípidos en el organismo. La lipasa sensible a hormonas (HSL por sus siglas en inglés) es la enzima limitante para la hidrólisis de triglicéridos en el tejido adiposo y la mayor efectora de la lipólisis inducida por catecolaminas (Jocken y Blaak, 2008). La señalización de catecolaminas, por medio de los receptores β -adrenérgicos, activa la vía de PKA la cual fosforila a HSL para mediar su activación y translocación a gotas lipídicas (Frühbeck et al., 2014). Para determinar si el AE promueve un aumento en el metabolismo de lípidos en ratones alimentados con una DAG, determinamos el estado de activación de HSL en el tejido adiposo epididimal (Figura 12A).

Observamos que los niveles de HSL total se encuentran disminuidos en los ratones que fueron habitados en el AE con respecto a los ratones control (DN AN) (Figura 12B). En cuanto al estado de activación de HSL observamos que la fosforilación de HSL en la Serina 660 (p-HSL) disminuyó en los ratones DAG AN con respecto a los ratones alimentados con una DN (Figura 12C). Aunque los niveles de HSL total se encontraban disminuidos en los ratones DAG AE, observamos que el AE rescató la disminución en la activación de HSL generada por la alimentación de una DAG (Figura 12C).

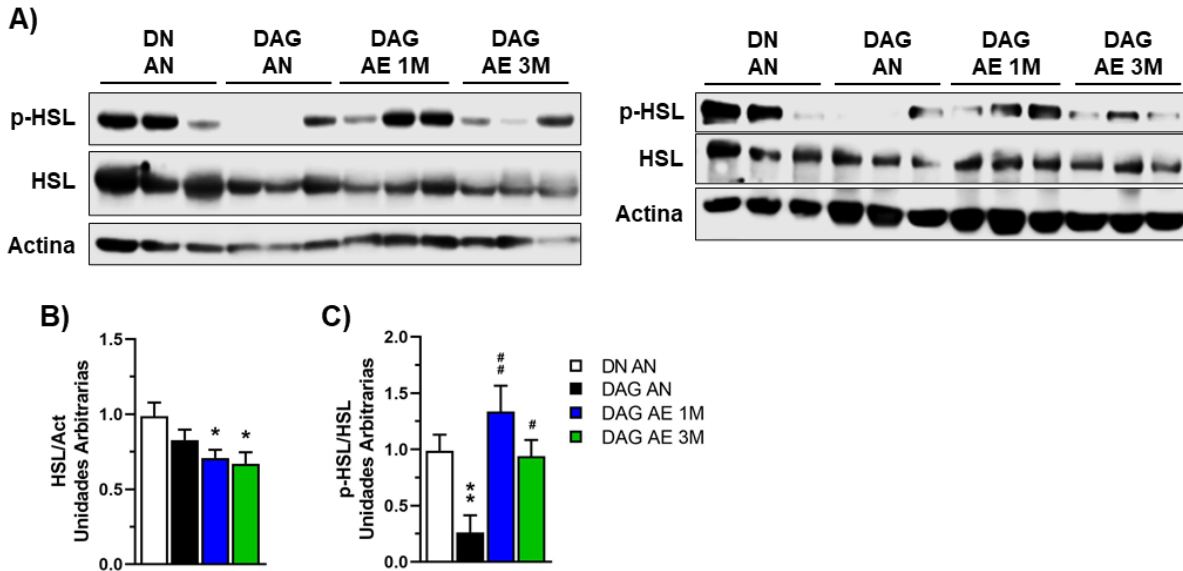


Figura 12 - El ambiente enriquecido incrementa los niveles de marcadores de lipólisis en el tejido adiposo

A) Western Blot mostrando la activación de HSL en el tejido adiposo epididimal. Niveles proteicos de HSL total (**B**) y de HSL fosforilado en la serina 660 (p-HSL) (**C**) en el tejido adiposo determinados por Western Blot (n=5). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

En años recientes se ha determinado que diferentes estímulos pueden favorecer la expresión de marcadores de tejido adiposo pardo en el tejido adiposo blanco en un proceso conocido como “browning”, lo cual tiene efectos benéficos en el metabolismo, aumentando el gasto de energía y disminuyendo la ganancia de peso (Seale et al., 2011; Wu et al., 2012a). Dado estos antecedentes, quisimos determinar si nuestro modelo de AE también promueve la expresión de marcadores de browning en el tejido adiposo epididimal (Figura 13). Observamos que los niveles de *Pdk4* (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4) (Figura 13A), *Cidea* (Cell death inducing DFFA like effector A) (Figura 13B) y de *Ucp1* (Uncoupling protein 1) (Figura 13C) aumentaron en el tejido adiposo de todos los grupos de ratones alimentados con una DAG. En el caso de la subunidad 7A1 de la citocromo C oxidasa *Cox7a1* (cytochrome c oxidase subunit 7A1) observamos que el AE aumentó su expresión en el tejido adiposo a comparación de los ratones DN AN (Figura 13D), el aumento de expresión también fue significativo en los ratones DAG AE 3M al comparar contra los ratones DAG AN. En el caso del factor de transcripción *Prdm16* (PR/SET Domain 16), observamos un aumento específico en los ratones DAG que fueron habitados en el AE por 3 meses con

respecto a los ratones DN AN (Figura 13E). Estos datos nos indican que el AE aumenta los niveles de marcadores de lipólisis y de browning, lo cual sugiere que en respuesta la AE, hay un aumento en el gasto de energía en el tejido adiposo que pudiera estar contribuyendo a las mejorías observadas en el metabolismo en los ratones alimentados con una DAG.

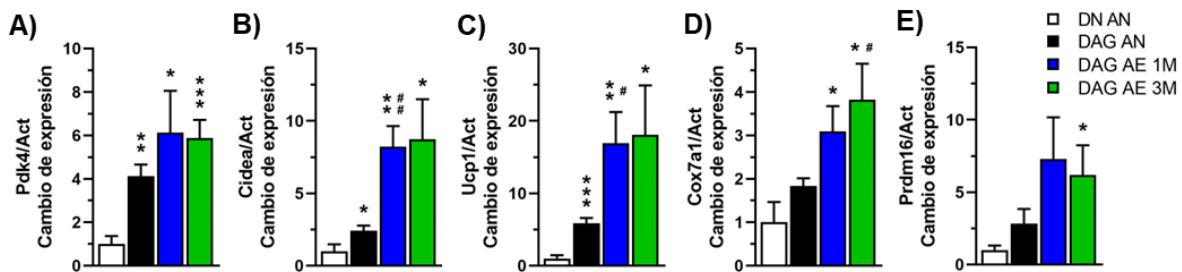


Figura 13 - El ambiente enriquecido incrementa los niveles de marcadores de tejido adiposo pardo en el tejido adiposo blanco epididimal

Niveles de expresión del RNA mensajero de los marcadores de browning *Pdk4* (A), *Cidea* (B), *Ucp1* (C), *Cox7a1* (D) y de *Prdm16* (E) en el tejido adiposo epididimal (n=5). Las gráficas representan la media ± el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REGULA LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN EL HIPOTÁLAMO EN RESPUESTA A UNA DIETA ALTA EN GRASA

El hipotálamo es la estructura dentro del cerebro encargada de mantener el balance energético. El hipotálamo recibe diferentes señales de la periferia acerca del estado nutricional del organismo para mediar el consumo de alimento y el gasto de energía, manteniendo la homeostasis (Morton et al., 2006). En los últimos años, se ha determinado que la expresión de microRNAs se ve alterada durante diferentes condiciones patológicas como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Heneghan et al., 2010; Ross y Davis, 2014). Adicionalmente, se ha observado que la expresión de microRNAs en el hipotálamo se encuentra alterada en modelos de obesidad en ratones y ratas (Crépin et al., 2014; Sangiao-Alvarellos et al., 2014). Estos antecedentes nos indican que los microRNAs pueden estar mediando la disfunción que se observa en el hipotálamo en un estado de obesidad, favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina y leptina. Dado que el ambiente enriquecido puede alterar la expresión génica y de microRNAs (Gomez et al., 2016; Kuzumaki et al., 2011; Rampon et al., 2000), decidimos determinar si el AE puede modificar la expresión de microRNAs en el hipotálamo de los ratones alimentados con una DAG.

Se extrajo RNA total de hipotálamos de los ratones en nuestras condiciones experimentales. Con la ayuda de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología se realizó la separación de los RNAs pequeños por tamaño y se construyeron librerías que fueron secuenciadas en el Genome Analyzer Iix (GAIIx) de Illumina. Se obtuvieron un total de 65'677,749 lecturas para las 15 muestras secuenciadas con un promedio de 3'562,765.7 lecturas por condición (Figura 14A, Tabla suplementaria 2). En colaboración con la Unidad Universitaria de Apoyo Bioinformático (UUAB) las secuencias fueron filtradas y mapeadas contra el genoma de ratón observando que arriba del 80% de las lecturas alinearon correctamente contra el genoma de ratón (Figura 14B, Tabla suplementaria 3). En promedio, el 74% de

las secuencias alineadas pertenecen a microRNAs, 1% a piRNAs (Piwi-interacting RNAs), y el otro 25% alineó en otras regiones que no corresponden a RNAs pequeños (Tabla suplementaria 3). En nuestras muestras de hipotálamo obtuvimos un total de 40,617,313 lecturas que corresponden a 1,424 microRNAs únicos. De estos microRNAs encontramos que el miR-127-3p fue el microRNA más expresado en nuestras muestras con casi el 30% de las lecturas correspondientes a microRNAs (Tabla 1, Tabla suplementaria 4).

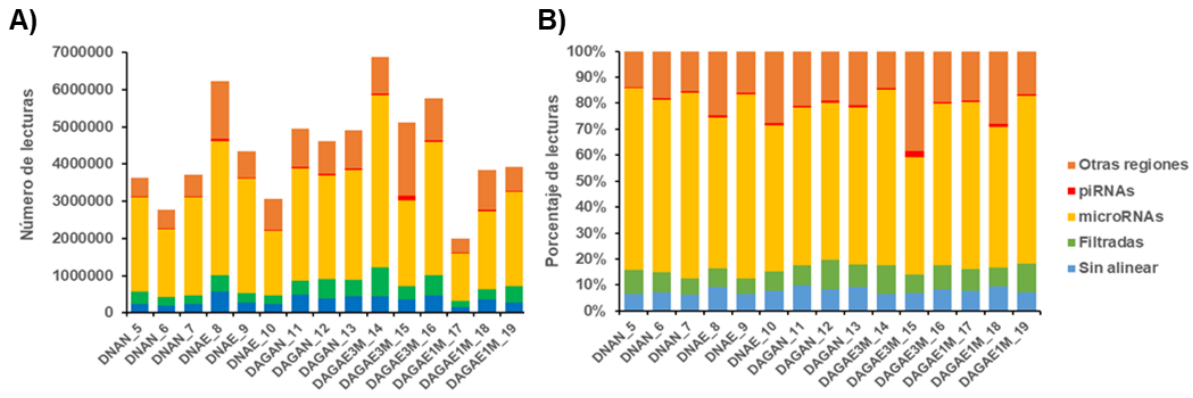


Figura 14 – Alineamiento de las secuencias de RNAs pequeños del hipotálamo de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales

A) Número de lecturas obtenidas de la secuenciación de RNAs pequeños para cada muestra. **B)** Porcentaje de lecturas que fueron filtradas, no alinearon, alinearon en regiones reportadas para RNAs pequeños (piRNAs y microRNAs) o que alinearon en regiones que no corresponden a RNAs pequeños.

Se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando 3 paquetes diferentes de Bioconductor (EdgeR, DESeq y NoiSeq) de donde se obtuvieron 111 microRNAs diferencialmente expresados entre nuestras condiciones experimentales (Figura 15A). Con estos parámetros encontramos 8 microRNAs diferencialmente expresados en los hipotálamos entre los grupos de ratones alimentados con una DN (DN AN vs DN AE), donde la expresión de 7 de estos microRNAs se encontraba aumentada y la de 1 microRNA se encontraba disminuida por el AE (Tabla suplementaria 5). Al comparar los grupos de ratones alimentados con una DN con los ratones DAG AN encontramos 13 microRNAs diferencialmente expresados entre los ratones alimentados con una DN o DAG mantenidos en condiciones habitacionales control (DN AN vs DAG AN) (Tabla suplementaria 5) y 29 miRs diferencialmente expresados entre los ratones DN AE al comparar con los DAG AN (Tabla suplementaria 5). Entre los microRNAs diferencialmente expresados entre los ratones alimentados con una DN y el grupo DAG AN, se ha descrito previamente que la expresión del miR-200a-3p, miR-200b-3p y miR-409-5p aumenta en el hipotálamo de ratones modelo de obesidad (Crépin et al., 2014). Al comparar entre los grupos de ratones alimentados con una DAG, encontramos que el mayor número de microRNAs diferencialmente expresados se encontraba entre las condiciones DAG AN y DAG AE 1M (50 microRNAs), donde 13 microRNAs presentaron un aumento de expresión en la condición DAG AE 1M y 37 presentaban una disminución en su expresión después de 1 mes en el AE (Tabla suplementaria 5). Entre las condiciones de DAG AN y DAG AE 3M encontramos 16 microRNAs diferencialmente expresados, 3 de los cuales aumentaron su expresión y 13 disminuyeron su expresión en la condición DAG AE 3M (Tabla suplementaria 5). En

combinación, estos resultados sugieren que el AE disminuye la expresión de microRNAs regulados por la alimentación con una DAG. Finalmente, encontramos 24 microRNAs diferencialmente expresados entre los ratones DAG AE, donde la exposición de 3 meses al AE aumentó la expresión de 24 y disminuyó la expresión de 3 microRNAs al comparar con los ratones que solo estuvieron 1 mes en el AE (Tabla suplementaria 5). Estos resultados nos indican que tanto la alimentación con una DAG como las diferentes condiciones habitacionales alteran la expresión de microRNAs en el hipotálamo.

microRNA	Suma	Min	Max	Promedio	Porcentaje	# muestras
miR-127-3p	12007136	432939	1343843	800475.73	29.56	15
miR-181a-5p	2820243	80392	354961	188016.20	6.94	15
miR-26a-5p	1887106	54165	221123	125807.07	4.65	15
miR-30a-5p	1185163	40748	132626	79010.87	2.92	15
miR-9-5p	1079320	29280	129676	71954.67	2.66	15
miR-434-3p	1069596	26837	133067	71306.40	2.63	15
let-7f-5p	1035119	26957	143773	69007.93	2.55	15
miR-22-3p	1020962	29175	125972	68064.13	2.51	15
miR-143-3p	962702	33100	100009	64180.13	2.37	15
miR-27b-3p	865921	26692	102127	57728.07	2.13	15
miR-410-3p	773680	21626	86376	51578.67	1.90	15
miR-541-5p	617442	20380	71848	41162.80	1.52	15
miR-191-5p	494101	16401	51828	32940.07	1.22	15
let-7c-5p	487148	14853	59052	32476.53	1.20	15
miR-125a-5p	472569	10269	50288	31504.60	1.16	15
miR-125b-5p	451313	9711	51991	30087.53	1.11	15
miR-92b-3p	450322	10426	58715	30021.47	1.11	15
miR-181c-5p	426344	13717	45460	28422.93	1.05	15
miR-99b-5p	406808	6209	82007	27120.53	1.00	15
miR-126b-3p	395196	14960	41030	26346.40	0.97	15

Tabla 1 – microRNAs más expresados en el hipotálamo obtenidos por los datos de secuenciación

Para reducir el número de microRNAs y aumentar la confiabilidad de los datos, se decidió tomar solamente los microRNAs que fueron encontrados por al menos dos de los tres métodos de análisis de expresión diferencial utilizados, quedándonos así con 41 microRNAs (Figura 15A, Figura suplementaria 2, tabla suplementaria 6). Al realizar un análisis de clustering para agrupar a los microRNAs que se expresaran de forma similar obtuvimos 3 grupos de interés (Figura 15B). En el clúster 1 observamos 7 microRNAs (miR-100, miR-125a, miR-125b, miR-409-5p, miR-501-3p, miR-674 y miR-99) que se encontraron altamente expresados en el hipotálamo de los ratones DAG AN y su expresión se encontró disminuida en los 2 grupos de AE (DAG AE 1M y DAG AE 3M). En el clúster 2 observamos 9 microRNAs (miR-181a, miR-182, miR-183, miR-1b-5p, miR-200a, miR-200b, miR-205, miR-223 y miR-429) que se encontraron altamente expresados en el grupo DAG AE 3M a comparación de otros dos grupos.

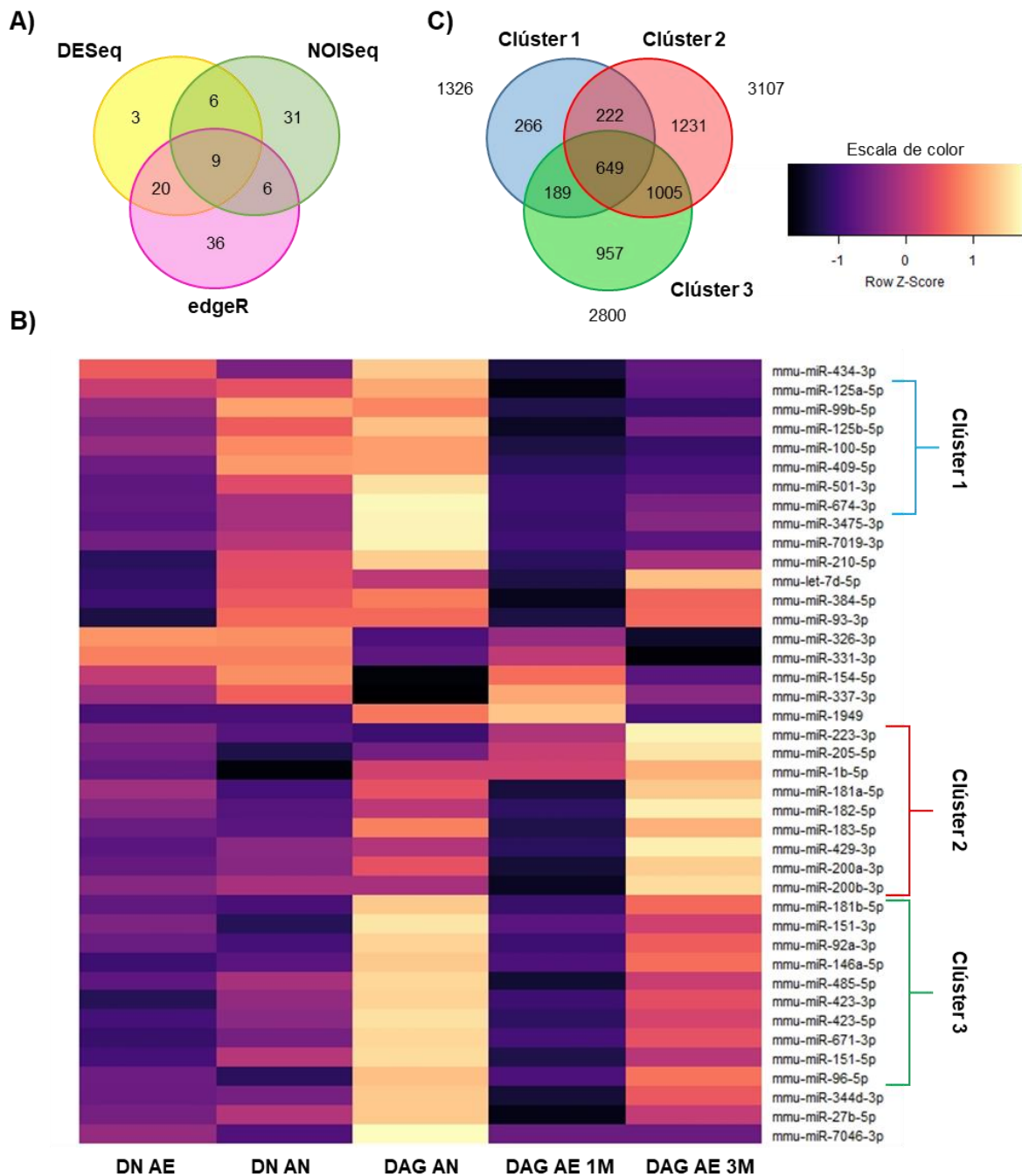


Figura 15 - El ambiente y la dieta alteran los niveles de expresión de microRNAs en el hipotálamo

A) Número de microRNAs diferencialmente expresados identificados por los paquetes de R DESeq, NOISEq y EdgeR. **B)** Mapa de calor representando la expresión de los 41 microRNAs que se expresaron diferencialmente entre nuestras condiciones experimentales. Al analizar el patrón de expresión se formaron 3 clústeres: el clúster 1 corresponde a microRNAs cuya expresión disminuye en los ratones DAG AE 1M y DAG AE 3M al comparar contra el grupo DAG AN, el clúster 2 corresponde a microRNAs cuya expresión aumenta en el grupo DAG AE 3M al comparar con otros dos grupos, el clúster 3 corresponde a microRNAs cuya expresión se encuentra disminuida en el grupo DAG AE 1M al comparar contra los grupos DAG AN y DAG AE 3M. **C)** Número de blancos predichos para los microRNAs de los 3 clústeres.

Mientras que en el grupo 3 observamos 10 microRNAs (miR-146, miR-151-3p, miR-151-5p, miR-181b, miR-423-3p, miR-423-5p, miR-485-5p, miR-671-3p, miR-92a y miR-96) que se expresaron altamente en el grupo DAG AN, su expresión disminuyó en el grupo DAG AE 1M y volvió a aumentar en los ratones DAG AE 3M.

Para obtener información acerca de las vías que estos microRNAs podrían estar regulando se buscaron los blancos putativos utilizando 2 programas de predicción de blancos de microRNAs (TargetScan y Pita) y buscando los blancos reportados en diferentes bases de datos (MirTarBase, MirWalk y miRecords), obteniendo 4297 blancos para el clúster 1, 6699 blancos para el clúster 2, y 9043 para el clúster 3 (Figura 15C). Para disminuir el número de blancos y aumentar la confiabilidad en las vías que estarían siendo reguladas se decidió tomar aquellos blancos que fueron compartidos por al menos la mitad de los microRNAs de cada clúster, reduciendo el número de blancos predichos a 1326 para el clúster 1, 3107 para el clúster 2 y 2800 para el clúster 3 (Figura 15C). Aún después de esta depuración, observamos 649 blancos que se seguían compartiendo entre los 3 clústeres, por lo que se decidió descartar estos blancos para el análisis de enriquecimiento de vías; por lo que se quedó con 677 blancos para el clúster 1, 2458 blancos para el clúster 2, y 2151 blancos para el clúster 3 (Figura 15C). Con esta lista de genes se realizó un análisis de enriquecimiento de vías utilizando el servidor de WebGestalt buscando en la base de datos de Kegg Pathway (Tablas 2-4).

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
1	MicroRNAs en cáncer	mmu05206	141	15	5.2705	2.8460	0.0002	0.0708
2	Biosíntesis de Glucosaminoglucanos	mmu00533	14	4	0.5233	7.6436	0.0014	0.1662
3	Vías en cáncer	mmu05200	395	27	14.7649	1.8287	0.0017	0.1662
4	Cáncer de mama	mmu05224	146	13	5.4574	2.3821	0.0031	0.2042
5	Biosíntesis de mucinas tipo O-glucanos	mmu00512	28	5	1.0466	4.7772	0.0034	0.2042
6	Cáncer de pulmón de células pequeñas	mmu05222	85	9	3.1773	2.8326	0.0043	0.2137
7	Vía de señalización de insulina	mmu04910	143	12	5.3453	2.2450	0.0071	0.2943
8	Resistencia a la insulina	mmu04931	111	10	4.1491	2.4101	0.0084	0.2943
9	Resistencia endocrina	mmu01522	95	9	3.5511	2.5345	0.0089	0.2943
10	Infección por HTLV-I	mmu05166	285	19	10.6532	1.7835	0.0102	0.3061
11	Metabolismo de ácido alfa-Linolénico	mmu00592	25	4	0.9345	4.2804	0.0130	0.3299
12	Vía de señalización de MAPK	mmu04010	252	17	9.4197	1.8047	0.0132	0.3299
13	Guiado axonal	mmu04360	177	13	6.6162	1.9649	0.0151	0.3319
14	Proteólisis mediada por ubiquitina	mmu04120	140	11	5.2331	2.1020	0.0155	0.3319
15	Biosíntesis de glucoesfingolípidos	mmu00604	15	3	0.5607	5.3505	0.0168	0.3357

Tabla 2 – Análisis de enriquecimiento de vías para los blancos predichos de los microRNAs del Clúster 1
Se muestran las 15 vías más enriquecidas FDR>0.05

Para el clúster 1 no encontramos vías enriquecidas con un FDR < 0.05 (Tabla 2). Observando las 15 vías más enriquecidas para los blancos del clúster 1 encontramos a la vía de señalización de insulina, resistencia a la insulina, señalización de MAPKs y guiado axonal, que correlacionan con las alteraciones

que se han caracterizado en el cerebro con el desarrollo de obesidad (Cai, 2013; Guillemot-Legrís y Muccioli, 2017).

En el caso de los blancos del clúster 2 se encontraron 45 vías enriquecidas, dentro de las cuales observamos vías asociadas con muerte celular (señalización de p53, apoptosis), al igual que vías involucradas en la regulación del metabolismo (Señalización de FoxO, señalización de AMPK, señalización de insulina y señalización de PI3K-AKT) (Tabla 3, Tabla suplementaria 7).

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
1	MicroRNAs en cáncer	mmu05206	141	40	17.6771	2.2628	3.18E-07	0.0001
2	Proteólisis mediada por ubiquitina	mmu04120	140	39	17.5517	2.2220	7.44E-07	0.0001
3	Invasión bacteriana de células epiteliales	mmu05100	78	25	9.7788	2.5565	4.93E-06	0.0005
4	Vías en cáncer	mmu05200	395	79	49.5209	1.5953	1.08E-05	0.0008
5	Vía de señalización de FoxO	mmu04068	134	34	16.7995	2.0239	3.36E-05	0.0020
6	Vía de señalización de Ras	mmu04014	230	50	28.8349	1.7340	5.25E-05	0.0026
7	Meiosis de ovocitos	mmu04114	116	30	14.5428	2.0629	6.57E-05	0.0028
8	Hepatitis B	mmu05161	145	35	18.1785	1.9253	7.89E-05	0.0029
9	Vía de señalización de p53	mmu04115	68	20	8.5251	2.3460	1.66E-04	0.0053
10	Proteoglicanos en cáncer	mmu05205	204	44	25.5753	1.7204	1.76E-04	0.0053
11	Vía de señalización de AMPK	mmu04152	129	31	16.1726	1.9168	2.17E-04	0.0059
12	Vía de señalización de Hippo	mmu04390	154	35	19.3069	1.8128	2.80E-04	0.0070
13	Vía de señalización de ErbB	mmu04012	87	23	10.9071	2.1087	3.22E-04	0.0074
14	Adicción a anfetaminas	mmu05031	68	19	8.5251	2.2287	4.94E-04	0.0105
15	Cáncer de pulmón de células pequeñas	mmu05222	85	22	10.6564	2.0645	5.92E-04	0.0118

Tabla 3 – Análisis de enriquecimiento de vías para los blancos predichos de los microRNAs del Clúster 2
Se muestran las primeras 15 vías enriquecidas FDR>0.05

En el análisis de enriquecimiento de vías para los blancos de los microRNAs del clúster 3 encontramos 84 vías enriquecidas, entre las que podemos destacar vías involucradas en la proliferación y diferenciación neuronal (señalización de Hippo, vías reguladoras de la pluripotencia de células troncales, señalización de ErbB, guiado axonal, sinapsis dopaminérgica, señalización de neurotrofinas, entre otras), vías relacionadas a procesos inflamatorios (vía de las MAPKs, señalización de quimiocinas, señalización de TNF), al igual que vías importantes en la regulación del metabolismo (señalización de FoxO, AMPK, PI3K-AKT, insulina, y mTOR) (Tabla 4, Tabla suplementaria 8). En general, estos resultados nos muestran que el ambiente enriquecido altera la expresión de diferentes microRNAs que estarían regulando vías importantes para el mantenimiento del balance energético y para la funcionalidad del hipotálamo.

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
1	MicroRNAs en cáncer	mmu05206	141	40	17.6771	2.2628	3.18E-07	0.0001
2	Proteólisis mediada por ubiquitina	mmu04120	140	39	17.5517	2.2220	7.44E-07	0.0001
3	Invasión bacteriana de células epiteliales	mmu05100	78	25	9.7788	2.5565	4.93E-06	0.0005
4	Vías en cáncer	mmu05200	395	79	49.5209	1.5953	1.08E-05	0.0008
5	Vía de señalización de FoxO	mmu04068	134	34	16.7995	2.0239	3.36E-05	0.0020
6	Vía de señalización de Ras	mmu04014	230	50	28.8349	1.7340	5.25E-05	0.0026
7	Meiosis de ovocitos	mmu04114	116	30	14.5428	2.0629	6.57E-05	0.0028
8	Hepatitis B	mmu05161	145	35	18.1785	1.9253	7.89E-05	0.0029
9	Vía de señalización de p53	mmu04115	68	20	8.5251	2.3460	1.66E-04	0.0053
10	Proteoglicanos en cáncer	mmu05205	204	44	25.5753	1.7204	1.76E-04	0.0053
11	Vía de señalización de AMPK	mmu04152	129	31	16.1726	1.9168	2.17E-04	0.0059
12	Vía de señalización de Hippo	mmu04390	154	35	19.3069	1.8128	2.80E-04	0.0070
13	Vía de señalización de ErbB	mmu04012	87	23	10.9071	2.1087	3.22E-04	0.0074
14	Adicción a anfetaminas	mmu05031	68	19	8.5251	2.2287	4.94E-04	0.0105
15	Cáncer de pulmón de células pequeñas	mmu05222	85	22	10.6564	2.0645	5.92E-04	0.0118

Tabla 4 – Análisis de enriquecimiento de vías para los blancos predichos de los microRNAs del Clúster 3
Se muestran las primeras 15 vías enriquecidas FDR>0.05

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO ALTERA LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS QUE REGULAN SEÑALES OREXIGÉNICAS

En el análisis de enriquecimiento de vías observamos varios componentes de la vía de señalización de FoxO que podrían estar siendo regulados por los microRNAs identificados en la secuenciación. En el hipotálamo, el factor de transcripción Foxo1 regula la transcripción de neuropéptidos involucrados en el mantenimiento del balance energético activando la expresión de los péptidos orexigénicos NPY y AgRP, e inhibiendo la expresión del péptido anorexigénico POMC (Iskandar et al., 2010; Kim et al., 2006; Kitamura et al., 2006).

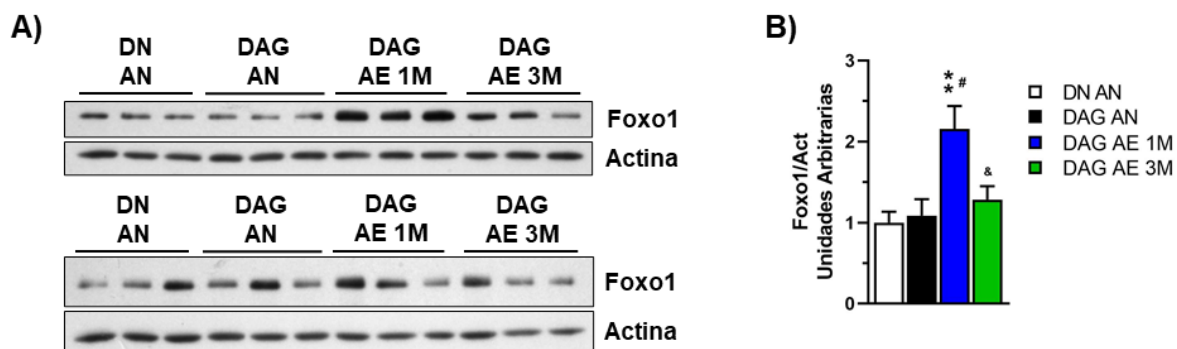


Figura 16 - El ambiente enriquecido incrementa los niveles de Foxo1 en el hipotálamo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

A) Western blot mostrando los niveles de Foxo1 en el hipotálamo. **B)** Cuantificación de los niveles de Foxo1 en el hipotálamo determinado por Western blot (n=6). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

En respuesta a la señalización de insulina Foxo1 es fosforilado, lo cual impide su traslocación al núcleo, favoreciendo las señales anorexigénicas (Marino et al., 2011). Al medir los niveles de Foxo1 en el hipotálamo de los ratones de nuestras condiciones experimentales, observamos un aumento en los niveles de Foxo1 total en los ratones alimentados con una DAG que fueron habitados en el ambiente enriquecido 1 mes (DAG AE 1M) a comparación de los otros 3 grupos (Figura 16A-B).

Entre los microRNAs que pudieran estar regulando la expresión de Foxo1 encontramos que el miR-96-5p tiene un posible sitio de unión en la 3'UTR de Foxo1 con una $\Delta\Delta G$ de -9.12. Adicionalmente, el miR-96-5p tiene un menor nivel de expresión en el grupo DAG AE 1M en comparación de los grupos DAG AN y DAG AE 3M (Figura 15B), lo cual correlaciona con los niveles elevados de la proteína de Foxo1 en el grupo DAG AE 1M (Figura 16). Para validar esta interacción se clonó un fragmento de 487 pares de bases de la 3'UTR de *Foxo1* en el vector psi-CHECK2 para realizar ensayos de luciferasa. Adicionalmente, se clonó al miR-96 y al miR-9 en el vector pcDNA3.1 para mediar su sobreexpresión, el miR-9 se utilizó como control negativo. Al realizar los ensayos de luciferasa co-transfectando los diferentes vectores en las células HEK293, observamos que el miR-96 redujo la actividad de luciferasa cuando se encontraba la 3'UTR de *Foxo1* (Figura 17). No se observó una disminución en la actividad de luciferasa con el vector pcDNA vacío o con el que contenía al miR-9 (Figura 17). Estos datos confirman que el miR-96-5p puede regular a *Foxo1* mediante la interacción con su 3'UTR.

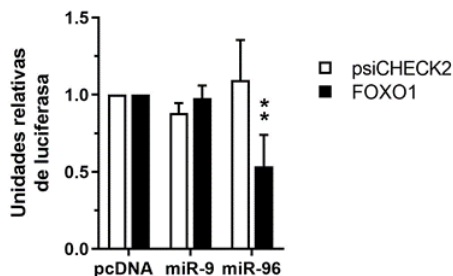


Figura 17 - El miR-96 regula a Foxo1 de forma postranscripcional

Niveles de luciferasa en células HEK293 transfectadas con el plásmido pcDNA vacío (pcDNA), o con construcciones para sobreexpresar al miR-9 y miR-96, junto con el plásmido psiCHECK2 vacío (psiCHECK), o con la 3' UTR de *Foxo1* (FOXO1) (n=3). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * vs psiCHECK

Adicionalmente, se ha reportado que el miR-223 tiene como blanco a *Foxo1* (Wu et al., 2012b). De manera interesante, el miR-223 presenta una mayor expresión en los ratones DAG AE 3M (Figura 15B), lo cual correlaciona con la disminución en los niveles proteicos de Foxo1 que observamos en el hipotálamo de estos ratones (Figura 16). A pesar de estas observaciones, aún queda por determinar si además del miR-96 y miR-223 existen otros microRNA dentro de los identificados en este estudio que pudiera regular los niveles de Foxo1 en el hipotálamo.

Dado que observamos que los niveles de Foxo1 se encontraban alterados en nuestras condiciones experimentales, quisimos determinar los niveles de expresión del RNA mensajero de diferentes neuropéptidos involucrados en la regulación del balance energético. En cuanto a los péptidos orexigénicos, observamos un aumento en la expresión de *Npy* en los ratones DAG AN al comparar contra los ratones DN AN (Figura 18A), mientras que al medir los niveles de expresión de *Agpr* no observamos diferencias

significativas entre nuestros grupos experimentales (Figura 18B). En el caso de los genes anorexigénicos observamos que la expresión de *Pomc* se encontraba elevada en el hipotálamo de los ratones DAG AE 1M (Figura 18C), en cambio en el caso de *Cart* observamos que su expresión se encontraba aumentada en los ratones DAG AE 3M (Figura 18D). Adicionalmente medimos los niveles de expresión de la hormona liberadora de corticotropina (*Crh*) y de la hormona liberadora de tirotrópina (*Trh*), las cuales se expresan en el núcleo paraventricular del hipotálamo y también son parte de la vía anorexigénica (Lechan y Fekete, 2006; Schwartz et al., 2000). Observamos una disminución en la expresión de *Trh* en el hipotálamo de ambos grupos de ratones DAG AE (Figura 18E), mientras que para *Crh* solo observamos una tendencia a la baja en los niveles de su RNA mensajero en los grupos DAG AE, aunque la diferencia no fue significativa (Figura 18F). Estos datos en su conjunto indican que el AE aumenta la expresión de genes anorexigénicos en el hipotálamo de ratones alimentados con una DAG a través de un mecanismo independiente de la regulación de *Trh* y *Crh*.

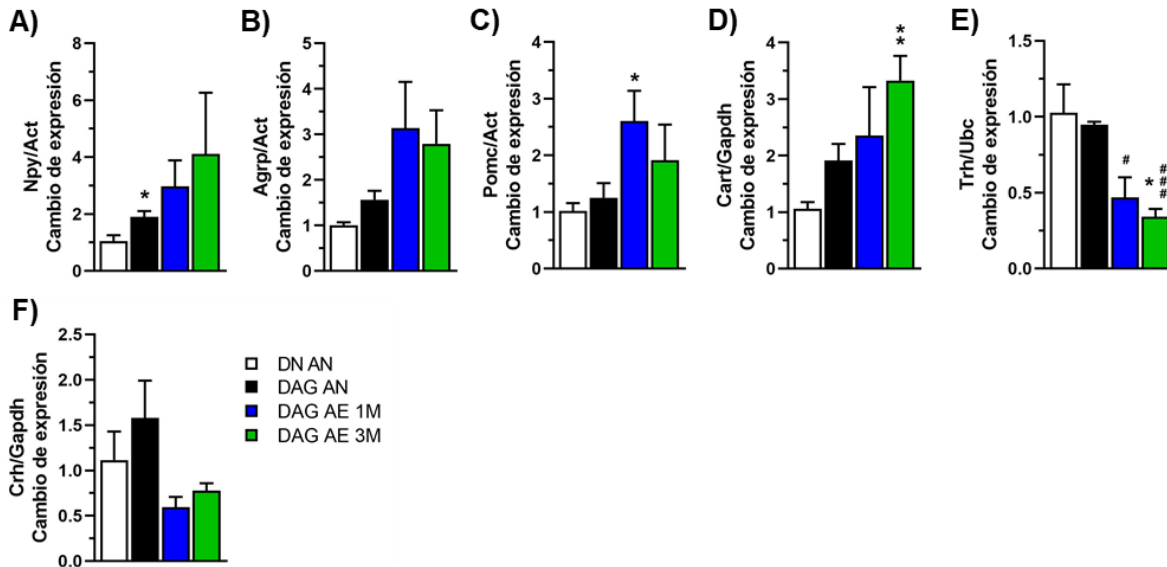


Figura 18 - El ambiente enriquecido modula la expresión de genes importantes en la regulación del balance energético en el hipotálamo

Niveles de expresión del RNA mensajero de los péptidos involucrados en la regulación del balance energético *Npy* (A), *Agrp* (B), *Pomc* (C), *Cart* (D), *Trh* (E), y *Crh* (F) en el hipotálamo determinado por qPCR (n=3). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

La neurotrofina BDNF ha sido ampliamente estudiada por sus diferentes funciones en el sistema nervioso central, dentro de ellas se ha visto que regula la maduración neuronal, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Rosas-Vargas et al., 2011). Adicionalmente, BDNF tiene un papel importante en la regulación del balance energético donde se ha visto que tiene efectos anorexigénicos (Godar et al., 2011). La insuficiencia de BDNF o de su receptor (TRKB) en el hipotálamo genera hiperfagia y obesidad (Geibel et al., 2014; Unger et al., 2007). Así mismo, la transferencia génica de BDNF al hipotálamo genera pérdida de peso y una reducción en la obesidad y la diabetes (Liu et al., 2014b). Dado que estudios previos

han determinado que la exposición a un ambiente enriquecido aumenta los niveles de BDNF en el hipotálamo (Cao et al., 2011), y que identificamos la vía de las neurotrofinas en nuestro análisis de enriquecimiento de vías para los blancos de los microRNAs del clúster 3 (Fig. 15B), decidimos buscar microRNAs que en nuestras condiciones pudieran estar regulando la expresión de BDNF.

microRNA	POSICIÓN EN UTR	SITIO DE UNIÓN	TIPO DE SITIO	CONTEXT SCORE	PERCENTIL DEL SCORE	$\Delta\Delta G$	CONSERVACIÓN	VALIDADO
miR-182-5p	245-251	TTGCCAA	7mer-m8	-0.24	90	-16.83	si	Li et al., 2016
miR-206-3p	213-219	ACATTCC	7mer-m8	-0.33	95	-15.72	si	Tapocik et al., 2014
miR-337-3p	1216-1223	GGAGCTGA	8mer	-0.33	96	-9.98	no	no
miR-181b-5p	1964-1970	TGAATGT	7mer-m8	-0.02	30	-9.57	no	no
miR-151-5p	217-223	TCCTCGA	7mer-A1	-0.33	88	-9.26	no	no
miR-200a-3p	1111-1117	CAGTGTT	7mer-m8	-0.08	71	-8.86	no	no
miR-423-5p	794-800	CCCCTCA	7mer-A1	-0.02	31	-7.3	no	no
miR-181a-5p	1964-1970	TGAATGT	7mer-m8	-0.02	30	-5.12	no	no
miR-206-3p	407-413	ACATTCC	7mer-m8	-0.3	94	-4.99	si	Tapocik et al., 2014
miR-125a-5p	2082-2089	CTCAGGGA	8mer	-0.21	88	-4.37	no	no
miR-200b-3p	1111-1117	CAGTGTT	7mer-m8	-0.08	71	-4.21	no	no
miR-125b-5p	2082-2090	CTCAGGGA	8mer	-0.21	88	-4.14	no	no
miR-154-5p	2248-2254	TAACCTA	7mer-A1	-0.14	84	-3.25	no	no
miR-384-5p	414-420	GTTTACA	7mer-A1	-0.16	77	-1.14	si	no
miR-125a-5p	821-827	TCAGGGA	7mer-A1	-0.06	56	-0.91	no	no
miR-206-3p	1306-1312	ACTT-ACATTCC	7mer-m8	-0.07	67	-0.76	no	Tapocik et al., 2014
miR-344d-3p	2740-2746	TTATATA	7mer-A1	-0.03	53	-0.47	no	no
miR-125b-5p	821-827	TCAGGGA	7mer-A1	-0.06	56	-0.31	no	no
miR-7046-3p	131-137	GTGGTTC	7mer-m8	-0.34	96	0.013	no	no
miR-434-3p	858-864	GTTCAAA	7mer-A1	-0.02	39	0.26	no	no
miR-200a-3p	1924-1930	AGTGTTA	7mer-A1	-0.02	37	2.95	no	no

Tabla 5 – sitios de unión para microRNAs en la 3' UTR de *Bdnf*

Sitios de unión de microRNAs de ratón en la 3' UTR de *Bdnf* (ENSMUST00000053317.6) predichos por TargetScan (Agarwal et al., 2015; Grimson et al., 2007) y PITA (Kertesz et al., 2007). Los valores de la posición, sitio de unión, tipo de sitio, context score, percentil del score y conservación fueron determinados por Targetscan, el valor de $\Delta\Delta G$ fue determinado por PITA.

Realizando un análisis de predicción de unión de microRNAs en la 3'UTR de *Bdnf* utilizando los programas PITA y Targetscan encontramos sitios de unión para 8 microRNAs (miR-182, miR-337-3p, miR-181a/b-5p, miR-151-5p, miR-200a/b-3p y miR-423-5p) identificados en nuestro análisis de expresión diferencial con un valor de $\Delta\Delta G < -6$ (Tabla 5, Figura suplementaria 3). De forma interesante, encontramos que los microRNAs miR-182 (identificado en el clúster 2) y miR-151-5p (identificado en el clúster 3) presentaban sitios de unión cercanos entre ellos en la 3' UTR de BDNF con un valor de $\Delta\Delta G < -9$, por lo que decidimos

validar estas interacciones por ensayos de luciferasa. Generamos una construcción que contiene 868 nucleótidos de la 3'UTR de *Bdnf* en el vector psiCHECK2. Así mismo, se clonaron los microRNAs miR-151, miR-182 y al miR-206 en el vector pcDNA3.1 para su sobre-expresión. Utilizamos al miR-206 como control positivo ya que se ha reportado como un regulador directo de BDNF (Tapocik et al., 2014). Se incluyó al miR-9 como control negativo. Al realizar ensayos de co-transfección en las células HEK293 observamos que los microRNAs miR-151, miR-182 y miR-206 disminuyeron la actividad de luciferasa al ser transfectados junto con el plásmido psiCHECK2 que contiene la 3'UTR de BDNF (Figura 19B). Para determinar si este efecto era específico para el miR-182, se realizó una mutación puntual (TTGCCAA mutado a CTGCCAA) en el sitio semilla predicho para el miR-182 en la 3'UTR de BDNF (BDNF-Mut182) (Figura 19A). Observamos que esta mutación impidió la disminución en la actividad de luciferasa mediada por la sobreexpresión del miR-182 sin afectar la unión del miR-151 o miR-206 (Figura 19B).

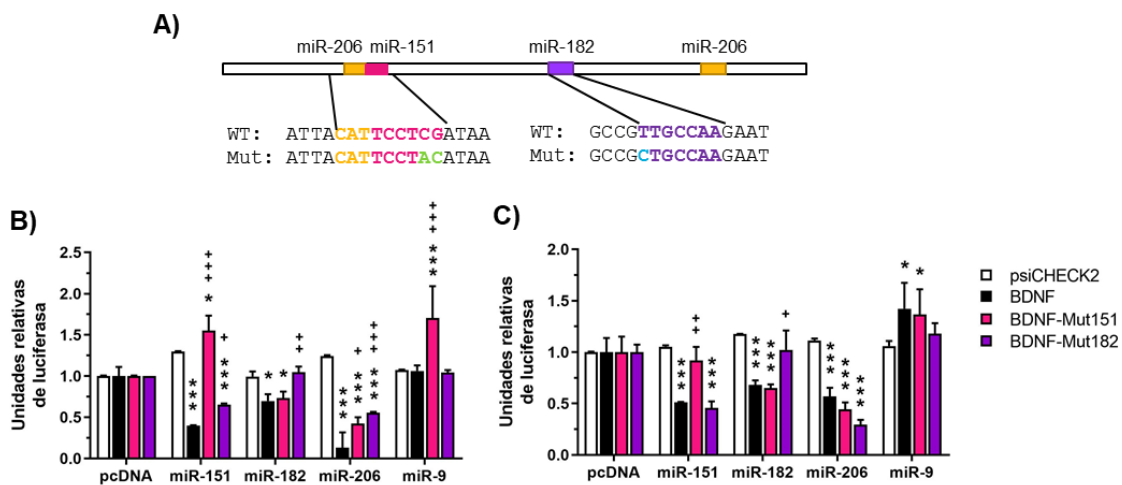


Figura 19 - Los microRNAs miR-151 y miR-182 regulan a *Bdnf*

A) Diagrama representando los sitios de unión para los microRNAs miR-206, miR-182 y miR-151 y las mutaciones que se hicieron en los sitios de los microRNAs miR-182 y miR-151. **(B-C)** Niveles de luciferasa en células HEK293T **(B)** o mHypoN1 **(C)** transfectadas con el plásmido pcDNA vacío (pcDNA), o con construcciones para sobreexpresar al miR-9, miR-151, miR-182 y miR-206, junto con el plásmido psiCHECK2 vacío (psiCHECK), con la 3' UTR de *Bdnf*, o con la 3'UTR de *Bdnf* mutada para los sitios de unión del miR-151 (BDNF-Mut151) o del miR-182 (BDNF-Mut182) (n=3). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, + psiCHECK, + vs BDNF.

Adicionalmente, mutamos el sitio semilla para el miR-151 en la 3' UTR de BDNF (BDNF-Mut151) (TCCTCG mutado a TCCTAC) (Figura 19A). Utilizando el vector BDNF-Mut151 observamos que se perdía el efecto represor del miR-151 sobre la expresión de luciferasa (Figura 19B), y que este efecto era específico para el miR-151 dado que no se vio un cambio en el efecto mediado por el miR-182 o miR-206 (Figura 19B). Para validar estos resultados en un contexto hipotalámico, se repitieron los experimentos de co-transfección con las diferentes construcciones de las UTRs y de los microRNAs en la línea celular hipotalámica mHypoN1 (Figura 19C). Al igual que en las células HEK293, en las células mHypoN1 observamos que la sobre-expresión de los microRNAs miR-151, miR-182 y miR-206 disminuyeron la actividad de luciferasa bajo el control de la 3'UTR de *Bdnf*. Adicionalmente, la represión mediada por los

microRNAs miR-182 y miR-151 es específica ya que la represión se perdió al mutar el sitio semilla para ambos microRNAs en la región 3'UTR de *Bdnf* (Figura 19C). Estos datos identifican por primera vez al miR-151-5p como un regular postranscripcional de BDNF y confirman la regulación negativa de BDNF por el miR-182 (Li et al., 2016).

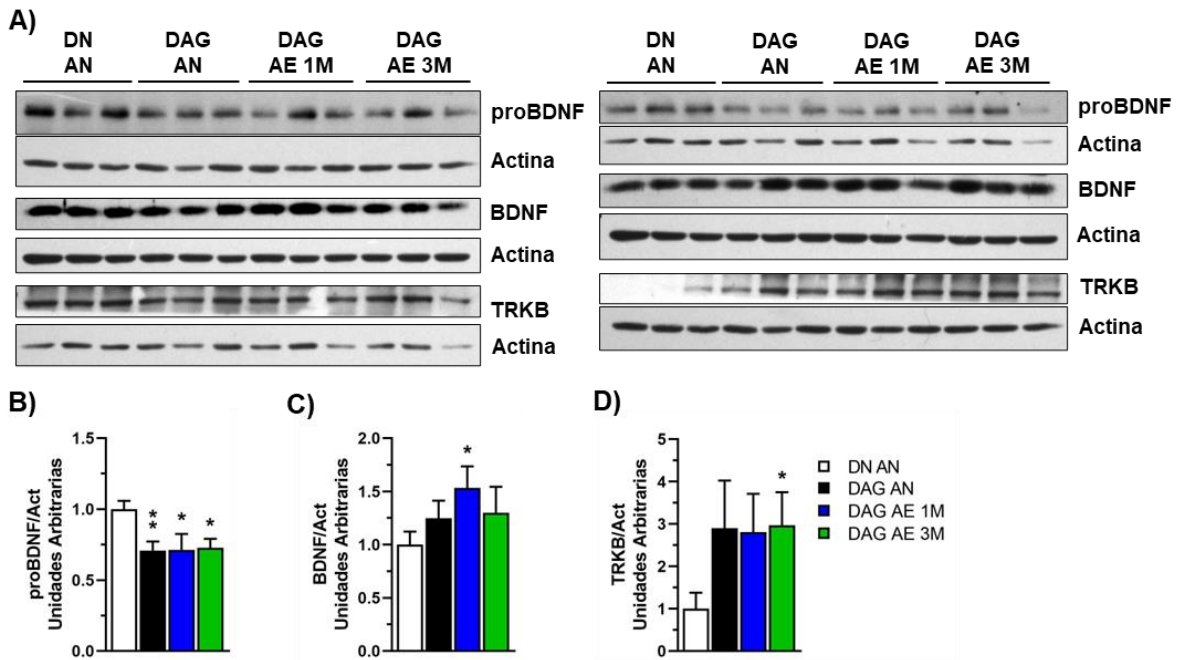


Figura 20 - El ambiente enriquecido aumenta los niveles de BDNF en el hipotálamo

A) Western Blot mostrando los niveles de proteínas de la vía de señalización de BDNF en el hipotálamo. Niveles proteicos de BDNF maduro (**B**), pro-BDNF (**C**) y TRKB (**D**) en el hipotálamo determinados por Western Blot (n=6). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M

Una vez que probamos que BDNF puede ser regulado por los microRNAs identificados en nuestra secuenciación, decidimos medir los niveles proteicos de BDNF y de su receptor en el hipotálamo de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 20A). Observamos que los niveles del precursor no maduro de BDNF (pro-BDNF) se encontraban disminuidos en el hipotálamo de los grupos de ratones alimentados con una dieta alta en grasa (DAG AN, DAG AE 1M y DAG AE 3M) en comparación con los ratones alimentados con una dieta normal (DN AN) (Figura 20B). En cambio, para la forma madura de BDNF observamos niveles elevados en el hipotálamo de los ratones que fueron expuestos al ambiente enriquecido durante 1 mes (Figura 20C). Estos resultados concuerdan con los niveles de los microRNAs miR-182 y miR-151, cuya expresión se encuentra disminuida en el grupo DAG AE 1M (Figura 15B). Adicionalmente, observamos que TRKB presenta un aumento en el grupo DAG AE 3M (Figura 20D). Esto sugiere que el ambiente enriquecido aumenta los niveles de BDNF en el hipotálamo, y que esta regulación puede estar siendo mediada por microRNAs específicos.

EL AMBIENTE ENRIQUECIDO REGULA MICRORNAS CUYOS BLANCOS PUTATIVOS REGULAN LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA Y DISMINUYE LA INFLAMACIÓN EN EL HIPOTÁLAMO DE RATONES ALIMENTADOS CON UNA DAG

En nuestro análisis de enriquecimiento de vías identificamos microRNAs, en los tres clústeres, que podrían regular proteínas clave en la señalización de insulina o mediadores de la resistencia a la insulina (Figura suplementaria 4, Tabla suplementaria 9). Para determinar si el ambiente enriquecido modula la activación de la vía de insulina decidimos medir los niveles de proteínas clave en esta vía de señalización en el hipotálamo de los ratones de nuestros grupos experimentales (Figura 21A).

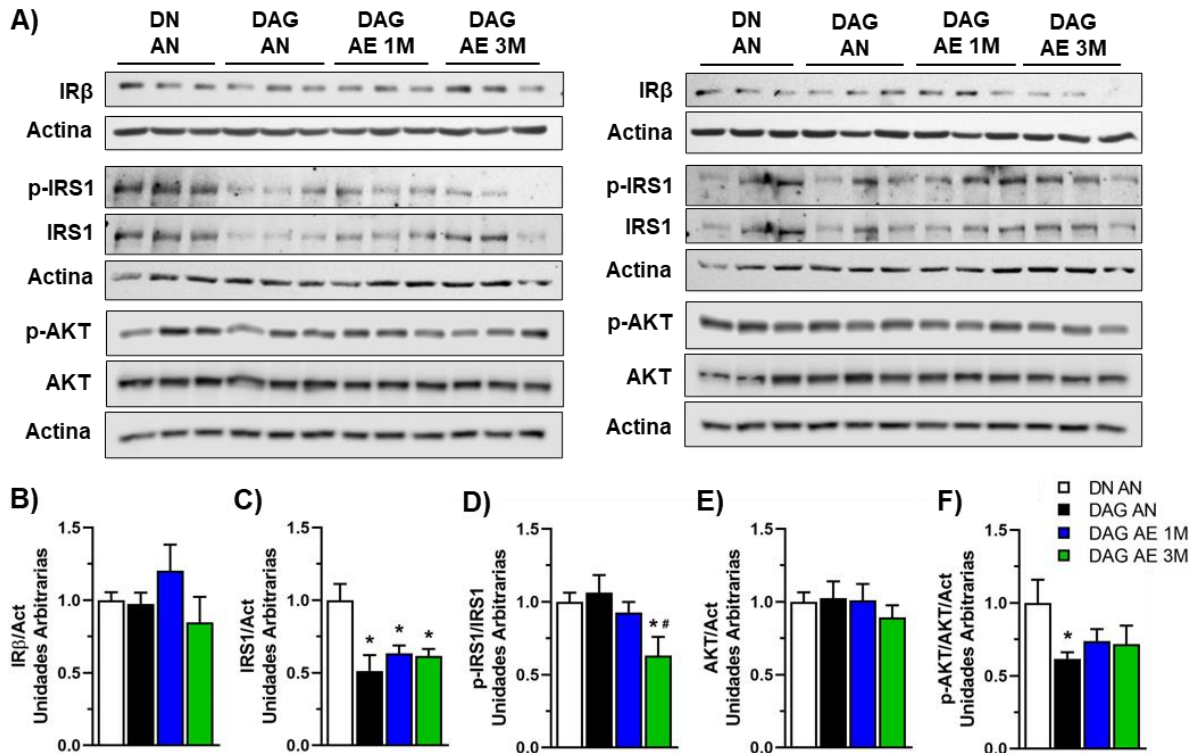


Figura 21 - La administración de una dieta alta en grasa inhibe la señalización de insulina en el hipotálamo

A) Western Blot mostrando las proteínas de la vía de señalización de insulina. Niveles proteicos de la subunidad beta del receptor de insulina (IRβ) (**B**), IRS1 total (**C**), IRS1 fosforilado en la serina 307 (p-IRS1) (**D**), AKT total (**E**), y AKT fosforilado en la serina 437 (p-AKT) (**F**) en el hipotálamo determinados por Western Blot (n=6). Las gráficas representan la media ± el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

No observamos diferencias en los niveles de la subunidad beta del receptor de insulina (IRβ) (Figura 21B), aunque se observó una tendencia al alza en el grupo DAG AE 1M similar a lo que observamos en el hígado (Figura 6D). En el caso de la proteína sustrato del receptor de insulina (IRS-1), encontramos niveles disminuidos en todos los grupos de ratones alimentados con una DAG (Figura 21C). Al medir los niveles de IRS-1 fosforilado en la serina 307 (p-IRS1), la cual es una fosforilación inhibitoria que impide su activación por el receptor de insulina (Aguirre et al., 2002; Gao et al., 2002), observamos niveles

disminuidos de p-IRS1 en el hipotálamo de los ratones DAG AE 3M al comparar con los ratones en un ambiente normal (DN AN y DAG AN) (Figura 21D). No encontramos cambios en los niveles de AKT total en el hipotálamo de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 21E). Finalmente, observamos una disminución en los niveles de AKT fosforilado en el grupo DAG AN, aunque no observamos que su activación en el hipotálamo fuera rescatada por el AE (Figura 21F). Estos datos confirman que la administración de una DAG inhibe la señalización de insulina en el hipotálamo, aunque no observamos que esta señalización fuera rescatada por el ambiente enriquecido.

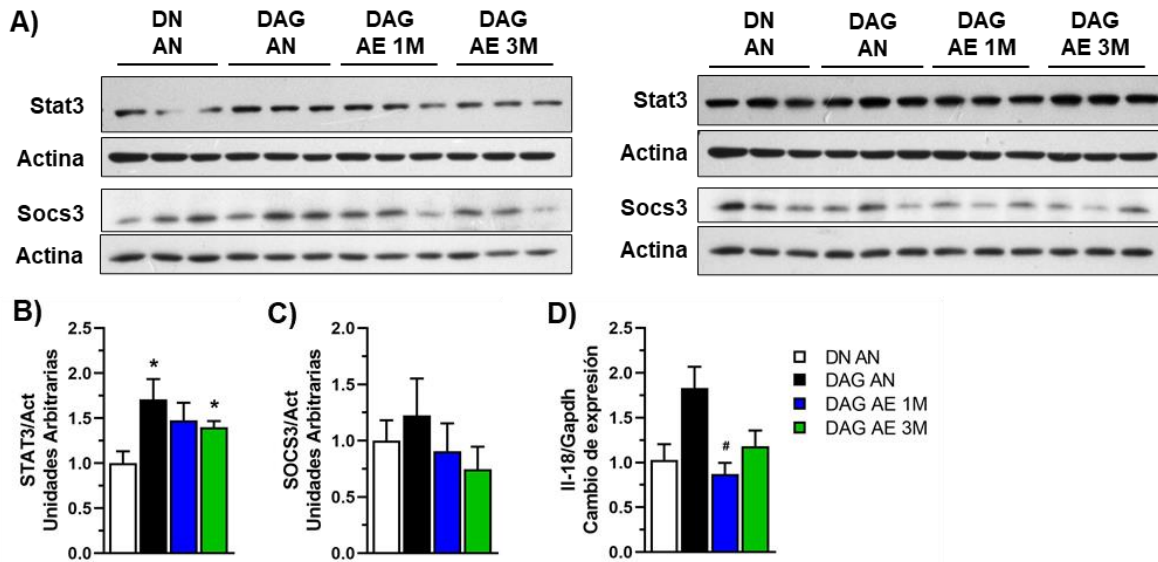


Figura 22 - Niveles de STAT3, SOCS3 e *IL18* en el hipotálamo de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales

A) Western Blot mostrando los niveles de Stat3 y Socs3 en el hipotálamo. Niveles proteicos de STAT3 (**B**) y SOCS3 (**C**) en el hipotálamo determinados por Western Blot (n=6). Niveles de expresión del RNA mensajero de *IL-18* en el hipotálamo determinados por qPCR. Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

El factor de transcripción STAT3 es activado por diferentes vías de señalización, incluyendo aquella mediada por leptina y por IL-6 (Nicolas et al., 2013). Adicionalmente, STAT3 regula la expresión de diferentes péptidos involucrados en la modulación del balance energético incluyendo *Npy* y *Pomc* (Muraoka et al., 2003; Xu et al., 2007). STAT3 inhibe su propia vía de señalización al promover la transcripción de SOCS3, el cual regula la fosforilación de JAK2 (Babon y Nicola, 2012). Observamos que, bajo nuestras condiciones experimentales, los niveles de STAT3 se encontraban elevados en el hipotálamo de los grupos DAG AN y DAG AE 3M (Figura 22A-B), mientras que los niveles de SOCS3 no se vieron alterados (Figura 22C). La citocina IL-18 es parte de la familia de IL-1 β , a la que se le han atribuido diferentes propiedades inflamatorias en diferentes modelos, aunque en el hipotálamo se ha descrito que también tiene un papel en la regulación de la ingesta (Alboni et al., 2010; Zorrilla et al., 2007). Determinamos que los niveles del mRNA de *IL-18* se encontraban aumentados en el hipotálamo de los

ratones alimentados con una DAG mantenidos en condiciones habitacionales control, y que sus niveles fueron disminuidos en los ratones que fueron habitados en el AE por 1 mes (Figura 22D).

Diferentes estudios han demostrado que durante un estado de obesidad se activan diferentes vías de señalización inflamatorias en el hipotálamo, entre ellas las vías de IKK/NF- κ B y de JNK, lo cual conlleva al desarrollo de resistencia a la insulina y a la leptina, promueve la activación de estrés de retículo endoplásmico, y a la muerte neuronal (De Souza et al., 2005; Moraes et al., 2009; Zhang et al., 2008). Así mismo, la delección de IKK β o JNK1 en neuronas genera resistencia al desarrollo de obesidad, disminuyendo la ingesta y aumentando la sensibilidad a la insulina (Benzler et al., 2013; Zhang et al., 2008). Dado estos antecedentes y que observamos una disminución en la inflamación en el tejido adiposo, decidimos determinar si el AE también pudiera regular estas vías de señalización inflamatorias en el hipotálamo (Figura 23A).

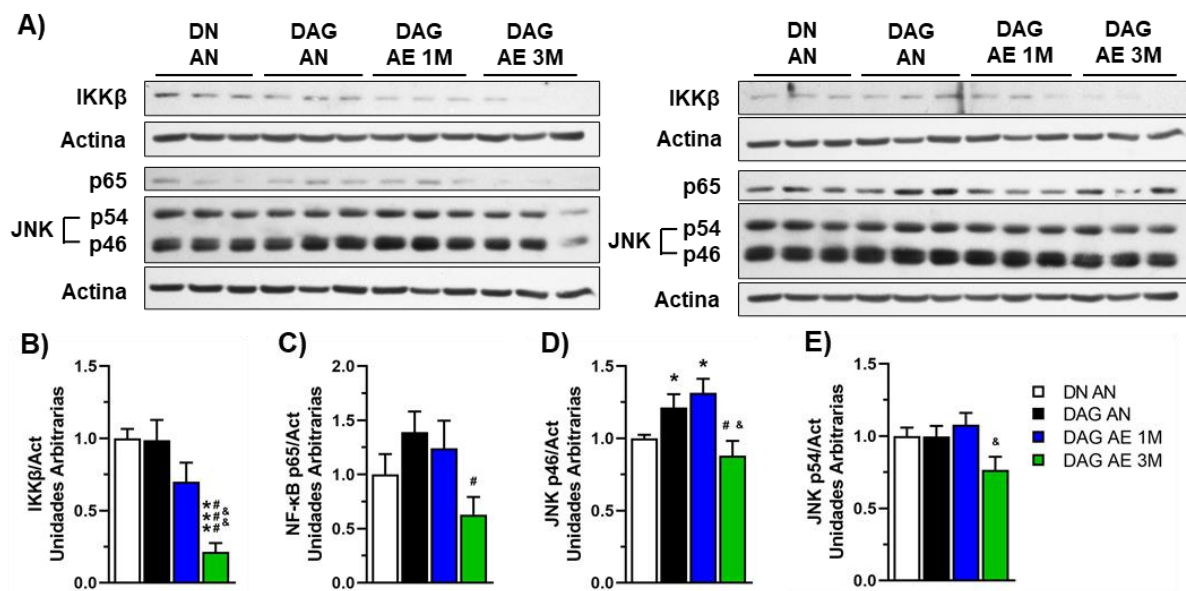


Figura 23 - El ambiente enriquecido disminuye los niveles de mediadores inflamatorios en el hipotálamo

A) Western Blot mostrando los niveles de proteínas de vías inflamatorias en el hipotálamo. Niveles proteicos de IKK β (**B**), subunidad p65 de NF- κ B (**C**), isoforma p46 de JNK (**D**), y de la isoforma p54 de JNK (**E**) en el hipotálamo determinados por Western Blot (n=6). Las gráficas representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, * vs DN AN, # vs DAG AN y & vs DAG AE 1M.

Observamos que los ratones alimentados con una DAG mantenidos en el AE por 3 meses mostraron una disminución en los niveles de IKK β (Figura 23B), la subunidad p65 de NF- κ B (Figura 23C), y la isoforma p46 de JNK (Figura 23D) al compararse con los ratones DAG AN. También observamos que los niveles de la isoforma p54 de JNK estaban disminuidos en el hipotálamo de los ratones DAG AE 3M con respecto a la de los ratones DAG AE 1M (Figura 23E). La disminución de JNK e IKK en el grupo DAG AE 3M correlaciona con la disminución observada en los niveles de p-IRS1 (Figura 21D), lo que sugiere que la actividad de estas cinasas también se encuentra disminuida dado que se sabe que son las responsables

de mediar esta fosforilación (Aguirre et al., 2000; Gao et al., 2002). Estos resultados nos indican que el AE disminuye el proceso inflamatorio en el hipotálamo generado por la administración de una dieta alta en grasa. En conjunto, nuestros datos muestran que el ambiente enriquecido puede actuar a diferentes niveles para reestablecer el balance energético y disminuir las alteraciones generadas por la obesidad.

DISCUSIÓN

En el tejido adiposo en homeóstasis, los adipocitos secretan adiponectina y los macrófagos presentan un fenotipo M2, propiciando un ambiente anti-inflamatorio en el tejido (Lumeng et al., 2007; Ouchi et al., 2011). Al haber un estado de sobre nutrición en el organismo, los adipocitos incrementan los niveles de moléculas inflamatorias como TNF, IL-6, CCL2 y CCL3, lo cual lleva a la activación de los macrófagos residentes del tejido adiposo y favorece el reclutamiento de más células del sistema inmune (Ouchi et al., 2011; Strissel et al., 2007). Diferentes estudios han demostrado que este estado inflamatorio derivado de la obesidad lleva a la activación de las vías de señalización de JNK e IKK, las cuales median el desarrollo de resistencia a la insulina en diferentes tejidos (de Luca y Olefsky, 2008; Hirosumi et al., 2002; Yuan et al., 2001). Usando un modelo de obesidad inducida por dieta confirmamos que la alimentación con una dieta alta en grasa lleva al reclutamiento de macrófagos y a un aumento en los niveles de quimiocinas y citocinas inflamatorias en el tejido adiposo epididimal, además de aumentar la acumulación de lípidos en el hígado y llevar al desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones.

En ratones modelo de obesidad se ha visto que la expresión de la quimiocina CCL2 (CC-chemokine ligand 2) aumenta en el tejido adiposo (Chen et al., 2005; Kamei et al., 2006). Adicionalmente, la sobreexpresión de CCL2 en el tejido adiposo aumenta el reclutamiento de macrófagos, aumenta la expresión de TNF e IL-6, e induce resistencia a la insulina en ratones alimentados tanto con una DN como con una DAG (Kamei et al., 2006). También se ha determinado que CCL2 promueve la proliferación de macrófagos en el tejido adiposo de ratones modelo de obesidad (Amano et al., 2014). En este trabajo observamos que la alimentación con una DAG aumenta los niveles de CCL2, como ha sido descrito anteriormente, mientras que la exposición a un AE disminuye los niveles de CCL2 en el tejido adiposo de ratones alimentados con una DAG. Esta disminución en los niveles de CCL2 correlaciona con una disminución en el infiltrado de macrófagos y de los niveles de mediadores inflamatorios en el tejido adiposo. Aun así, otros estudios han reportado resultados contrarios al utilizar ratones carentes de CCL2 o de su receptor (CCR2) para determinar los efectos de la señalización de esta quimiocina en modelos de obesidad e inflamación (Amano et al., 2014; Chen et al., 2005; Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006). Dado esto, se requiere de más estudios para determinar el papel de CCL2 en el reclutamiento y activación de macrófagos durante la obesidad, además de determinar si la disminución en el infiltrado de células inmunes en el AE está mediada por la reducción de sus niveles proteicos.

En nuestras condiciones experimentales también observamos que la administración de una DAG redujo los niveles de CXCL12 en el tejido adiposo epididimal, mientras que el AE aumentó los niveles de esta quimiocina. Otros estudios han demostrado que CXCL12 media el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo y que la expresión de CXCL12 aumenta durante la obesidad (Kim et al., 2014). Sin embargo, la deficiencia de CXCR4 (el receptor para CXCL12) lleva a un mayor reclutamiento de macrófagos M1 y de linfocitos T CD4 al tejido adiposo, genera un aumento en la adiposidad y en la ganancia de peso, además

de que inhibe la termogénesis en el tejido adiposo pardo en ratones alimentados con una DAG (Yao et al., 2014). Aunque nuestros resultados podrían apoyar un papel anti-inflamatorio para CXCL12, además de que se ha reportado un papel dual de la señalización de CXCL12/CXCR4 en el tejido adiposo durante un estado de obesidad (Vidaković et al., 2015), se requieren de más estudios para elucidar el papel de esta vía de señalización en respuesta al AE.

Se ha observado que inhibir la inflamación o promover un estado anti-inflamatorio en el tejido adiposo mejora el metabolismo de ratones modelo de obesidad. La delección de JNK1 en el tejido adiposo reduce los niveles de IL-6 y previene el desarrollo de resistencia a la insulina y de esteatosis hepática en un modelo de obesidad inducido por dieta (Sabio et al., 2008). Así mismo, promover la polarización M2 en macrófagos disminuye la inflamación y aumenta la expresión de marcadores de browning en el tejido adiposo, además de que reduce la acumulación de lípidos en el hígado y rescata la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a insulina en ratones alimentados con una DAG (Zhao et al., 2018). En este trabajo encontramos que la exposición a un AE reduce los niveles de quimiocinas involucradas en el reclutamiento de células inmunes (entre ellas CCL2, CCL5, CCL9, CCL11, CCL24 y CXCL1), además de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF e IL-6 en el tejido adiposo de ratones alimentados con una DAG. Estos datos correlacionan con una disminución en el infiltrado de macrófagos CD68+ y CD163+ en el tejido adiposo de los ratones habitados en el AE alimentados con una DAG. Adicionalmente, otros estudios han mostrado que pacientes obesos que todavía mantienen la sensibilidad a la insulina tienen un menor infiltrado de macrófagos y expresión de quimiocinas en el tejido adiposo blanco (Hardy et al., 2012; Klötting et al., 2010). Otros estudios han visto que el AE altera la activación del sistema inmune, promoviendo un fenotipo anti-inflamatorio en linfocitos T y macrófagos (Chabry et al., 2015; Xiao et al., 2019). En concordancia con esto, encontramos que el AE aumenta los niveles de IL-4 e IL-10 en el tejido adiposo epididimal, estas citocinas favorecen la polarización M2 de macrófagos y un estado anti-inflamatorio en el tejido adiposo (Ji et al., 2012; Lumeng et al., 2007). Estos resultados sugieren que el AE disminuye la expresión de quimiocinas y citocinas inflamatorias lo cual previene el reclutamiento de células del sistema inmune al tejido adiposo y también podría favorecer la polarización de estas células hacia un fenotipo anti-inflamatorio en ratones alimentados con una DAG. Aun así, faltaría determinar que otras poblaciones de células inmunes estarían siendo afectadas y su estado de activación en nuestras condiciones experimentales. Nuestros resultados muestran que el AE podría funcionar como una estrategia terapéutica para contrarrestar el estado inflamatorio causado por una obesidad para favorecer el mantenimiento del metabolismo de glucosa del organismo.

Estudios anteriores han reportado resultados contradictorios en cuanto al efecto del AE en la ganancia de peso, algunos estudios han reportado que ratones alimentados con una DN presentan una disminución en el peso al ser habitados en condiciones de AE (Cao et al., 2011), mientras que en otros estudios no se ha observado una diferencia en el peso entre condiciones ambientales (Mainardi et al., 2010; Tsai et al., 2002). Nosotros no observamos una diferencia significativa en el peso o en algún otro parámetro

metabólico en los ratones alimentados con una DN entre las condiciones habitacionales control o de AE, lo cual podría ser explicado por la ausencia de ruedas de ejercicio en nuestro modelo de AE. Aun así, al comparar los resultados obtenidos antes del cambio de condiciones habitacionales (a las 13 semanas) con los obtenidos al final del experimento (25 semanas), observamos una ligera ganancia de peso, un aumento en los niveles de glucosa en ayuno y una disminución en la sensibilidad a la insulina en los ratones alimentados con una DN que se mantuvieron en el AN, mientras que la exposición al AE previno estos cambios. Estos resultados sugieren que el AE podría retrasar o prevenir el desarrollo de alteraciones metabólicas durante el envejecimiento, pero se requiere más información para determinar el papel del AE durante el envejecimiento.

En el caso de los ratones alimentados con una DAG observamos que los ratones que fueron habitados en el AE presentaron una pérdida de peso después del cambio de condiciones habitacionales. Esta disminución en el peso fue probablemente causada por una disminución en la ingesta, aunque no se puede descartar que el aumento en la actividad física también tuviera un impacto. Aun así, no podemos atribuir todos los efectos benéficos del AE a la pérdida de peso, dado que observamos una disminución de los niveles de glucosa en ayuno, al igual que un aumento en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a la insulina en ratones del grupo DAG AE 3M que presentaba el mismo peso final que los ratones DAG AN. Sin embargo, observamos que la señalización de insulina solo se encontraba aumentada en el hígado de los ratones DAG AE 1M, aunque observamos una mejoría en la tolerancia a la glucosa en ambos grupos de ratones DAG AE. Estos resultados nos sugieren que el aumento en la tolerancia a la glucosa en el grupo DAG AE 3M podría estar dada por un aumento en la secreción de insulina o en la efectividad de la glucosa (Tonelli et al., 2005), ambos procesos se han visto disminuidos en ratones alimentados con una DAG (Ahrén y Pacini, 2002), pero faltaría determinar si también son regulados por el AE. Otros estudios han mostrado que la pérdida de peso mejora la sensibilidad a la insulina y disminuye la inflamación en el hígado de forma rápida (Schmitz et al., 2016), aunque la inflamación en el tejido adiposo persiste por un periodo de tiempo mayor. Adicionalmente, se ha observado que una reducción en la inflamación (especialmente en el tejido adiposo, hígado y en el cerebro) aumenta la señalización de insulina en el hígado (Arkan et al., 2005; Belgardt et al., 2010; Sabio et al., 2008; Yuan et al., 2001). En nuestras condiciones, observamos que el AE disminuyó la inflamación generada por la alimentación de una DAG en el tejido adiposo y en el hipotálamo. Estos datos en conjunto podrían explicar el aumento en la señalización de insulina observado en el grupo DAG AE 1M.

Uno de los problemas de estudiar los efectos del AE es que no hay una definición estandarizada de lo que éste representa, por lo que cada grupo utiliza su propia definición lo cual dificulta la comparación entre estudios (Abou-Ismaïl, 2011; Burke et al., 2007; Fares et al., 2013; Gubert y Hannan, 2019; Simpson y Kelly, 2012). Algunos modelos de AE solamente incluyen juguetes (Arranz et al., 2010; Marashi et al., 2003), otros agregan ruedas de ejercicio (Barak et al., 2013; Meng et al., 2019; Queen et al., 2020), mientras que otros estudios también cohabitan a un mayor número de animales por jaula (Cao et al., 2010;

Jankowsky et al., 2005; van Praag et al., 1999; Xiao et al., 2019; Zarif et al., 2018). Dada esta variabilidad, diferentes estudios han intentado elucidar la contribución de los componentes del AE en los resultados observados. En algunos modelos se ha visto que el ejercicio contribuye a la mayor parte de los efectos benéficos del AE (Brenes et al., 2016; Prado Lima et al., 2018). En cambio, otros estudios han demostrado que la combinación de los diferentes componentes del AE (estimulación física, social o cognitiva) tienen un efecto mayor que cada componente por sí mismo (Grégoire et al., 2014; Langdon y Corbett, 2012). En modelos de obesidad inducida por dieta se ha visto que el ejercicio disminuye la ganancia de peso, mejora la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, disminuye la inflamación y reclutamiento de células inmunes en el tejido adiposo, restablece la señalización de leptina y disminuye marcadores inflamatorios en el hipotálamo (Bradley et al., 2008; Marinho et al., 2018; Wasinski et al., 2013). Sin embargo, el ejercicio por sí solo no recapitula el efecto del AE en reducir la adiposidad o en los cambios en la expresión génica observados en el hipotálamo y en diferentes depósitos de tejido adiposo en ratones alimentados con una DAG (Cao et al., 2011). Aun así, resulta indispensable trabajar en una definición estandarizada de lo que constituye un ambiente enriquecido y establecer una forma de cuantificar el efecto de las diferentes variables para determinar su contribución en los modelos estudiados. Esto permitirá una mayor comprensión de los componentes lo cual permitirá en un futuro optimizar el modelo de ambiente enriquecido.

El proceso inflamatorio asociado a la obesidad también inhibe la vía de señalización de catecolaminas en el tejido adiposo, impidiendo la fosforilación de HSL y el aumento en UCP1 (Mowers et al., 2013). Adicionalmente, estudios en ratones envejecidos han demostrado que la inflamación dependiente de NLRP3 en macrófagos del tejido adiposo aumenta la expresión de genes involucrados en el catabolismo de catecolaminas, inhibiendo el aumento en la lipólisis inducido por catecolaminas (Camell et al., 2017). En nuestro estudio observamos que la alimentación con una DAG disminuye la fosforilación de HSL, mientras que el AE aumenta los niveles de HSL fosforilado, lo cual sugiere que el AE promueve la lipólisis en el tejido adiposo. Estudios anteriores han demostrado que la liberación de catecolaminas mediada por el sistema nervioso simpático activa a los receptores β -adrenérgicos en el tejido adiposo, favoreciendo el browning (Harms y Seale, 2013). El proceso de browning en el tejido adiposo blanco aumenta el gasto de energía y la termogénesis, teniendo un efecto benéfico en el metabolismo (Boström et al., 2012; Seale et al., 2011). Nosotros observamos que el AE aumenta la expresión de marcadores de browning en el tejido adiposo epididimal de los ratones que fueron alimentados con una DAG, entre ellos Ucp1. Esto sugiere que, en nuestras condiciones experimentales, el AE podría aumentar la liberación de catecolaminas o restablecer la señalización de catecolaminas en el tejido adiposo para mediar los efectos benéficos observados en el metabolismo de glucosa. Adicionalmente, también se ha observado que las catecolaminas regulan la función del sistema inmune, reduciendo la respuesta inflamatoria de macrófagos (Barnes et al., 2015). Estos datos nos hacen preguntarnos si en nuestras condiciones experimentales la

reducción en la inflamación mejora la señalización de catecolaminas, o si aumentar la señalización de catecolaminas reduce el proceso inflamatorio en el tejido adiposo.

Aunque observamos un aumento en la activación de HSL y en la expresión de Ucp1 en el tejido adiposo de los ratones del grupo DAG AE 3M, estos ratones continuaron ganando peso después de la pérdida de peso inicial observada al cambiar las condiciones habitacionales. Estos resultados sugieren que los ratones podrían estar habituando al AE y que, aunque no haya una inhibición en la señalización de catecolaminas, el gasto energético todavía podría estar disminuido. Otros estudios han demostrado que el aumento en la respiración celular mediado por la activación de los receptores β -adrenérgicos se encuentra disminuida en adipocitos de tejido adiposo blanco de pacientes obesos, aunque la lipólisis no se encuentre afectada (Yehuda-Shnaidman et al., 2010). Adicionalmente, la estimulación de los receptores β -adrenérgicos en ratones con adipocitos deficientes de STAT3 incrementa la activación de HSL y la lipólisis, pero no se observa un aumento en la utilización de ácidos grasos ni el consumo de oxígeno (Reilly et al., 2020). Esto nos indica que se requieren de más estudios para determinar el mecanismo por el cual el AE estaría mejorando el metabolismo de glucosa aun en un estado de obesidad, además de que faltaría comprobar si el AE está favoreciendo el gasto de energía en los ratones alimentados con una DAG.

Los microRNAs han sido ampliamente estudiados como reguladores de diferentes procesos, incluyendo la obesidad y la diabetes tipo II (Ross y Davis, 2014). Estudios anteriores han determinado que la expresión de microRNAs en el hipotálamo se ve alterada en modelos de obesidad en murinos (Benoit et al., 2013; Crépin et al., 2014; Sangiao-Alvarellos et al., 2014). La importancia de los microRNAs en la funcionalidad del hipotálamo y en la regulación de la obesidad se ha mostrado mediante la delección de la enzima procesadora de microRNAs DICER en neuronas hipotalámicas, lo cual lleva al desarrollo de hiperfagia y un aumento en la ganancia de peso (Schneeberger et al., 2012; Vinnikov et al., 2014). En nuestro estudio observamos que la expresión de los microRNAs en el hipotálamo se encontraba alterada por la administración de una DAG. Encontramos 15 microRNAs diferencialmente expresados entre el grupo DAG AN comparando con los ratones alimentados con una DN. Dentro de estos microRNAs, se ha observado que los microRNAs miR-125a-5p, miR-200a-3p y miR-409-5p se encuentran sobre expresados en el hipotálamo en modelos de obesidad en ratones (Crépin et al., 2014; Sangiao-Alvarellos et al., 2014). Adicionalmente, diferentes estudios han determinado que el AE modula la expresión de microRNAs en diferentes regiones del cerebro (Barak et al., 2013; Ergen et al., 2021; Nakano et al., 2020; Vallès et al., 2014; Vannan et al., 2021; Wei et al., 2020). Entre estos estudios, se ha visto que la expresión de microRNAs es regulada de forma contraria en el hipocampo en un modelo de Alzheimer y por el AE (Barak et al., 2013). Esto se asemeja a lo encontrado en este estudio donde vemos que el AE (especialmente en el grupo de 1M) disminuye la expresión de microRNAs que fueron aumentados con la alimentación de una DAG en el hipotálamo.

Dentro de los microRNAs cuya expresión disminuyó por el AE en ratones alimentados con una DAG, encontramos algunos microRNAs que tienen blancos reportados en la vía de señalización de insulina. El miR-99 y miR-100, cuya expresión aumenta en los ratones DAG AN y disminuye en los ratones DAG AE, pertenecen a la misma familia de microRNAs y se ha visto que pueden regular a IGF1R, AKT y mTOR (Jin et al., 2013) (Figura 24). Adicionalmente, se ha demostrado que el miR-96 inhibe a IRS1, al receptor de insulina y a mTOR (Ma et al., 2014; Yang et al., 2016) (Figura 24), este microRNA se encontró disminuido en el grupo DAG AE 1M. La familia del miR-200 (miR-200a, miR-200b y miR-429) aumenta su expresión en el hipotálamo de ratones ob/ob, donde se ha visto que regula negativamente los niveles de IRS2 y del receptor de leptina (Crépin et al., 2014) (Figura 24). Nosotros observamos que el miR-200a se encontraba sobre expresado en los ratones alimentados con una DAG al comparar con los ratones alimentados con una DN, sin embargo, también observamos que el miR-200a, miR-200b y miR-429 se encontraban aumentados en el hipotálamo del grupo DAG AE 3M. Se ha determinado que el miR-125a regula a STAT3 (Liu et al., 2011) (Figura 24), nosotros encontramos que la expresión de este microRNA se encuentra disminuida en los ratones alimentados con una DAG expuestos al AE. De manera adicional a estos microRNAs con blancos validados, nosotros encontramos que la vía de señalización de insulina se encontraba enriquecida en los blancos predichos de los diferentes clústeres de microRNAs encontrados en este estudio (Figura suplementaria 4 y tabla suplementaria 9). Por lo que faltaría determinar cuáles de estos blancos putativos son regulados directamente por los microRNAs y su efecto en la señalización de insulina.

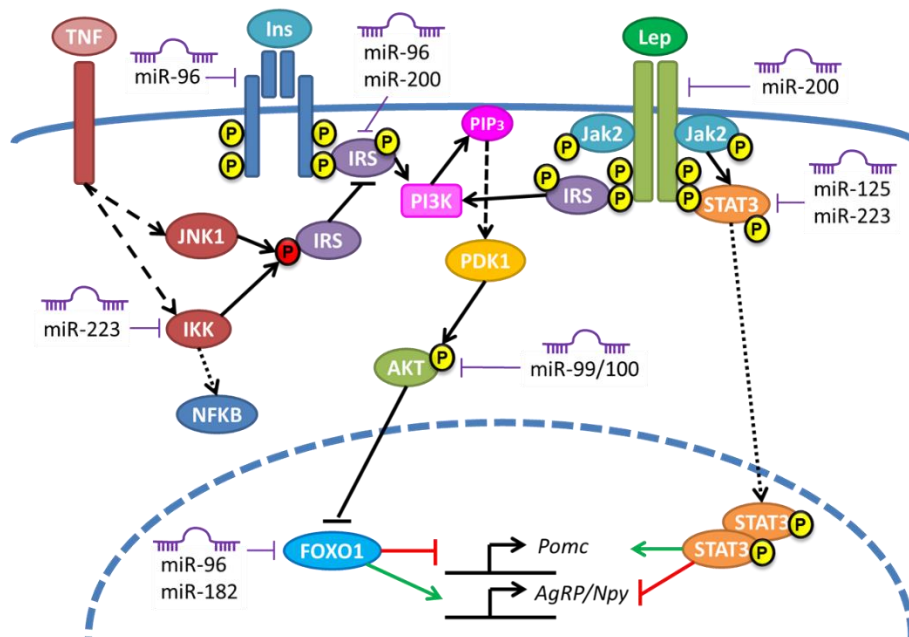


Figura 24 – microRNAs que regulan la señalización de insulina

microRNAs encontrados en la secuenciación de hipotálamo de los ratones de nuestro estudio con blancos validados involucrados en la señalización de insulina

La obesidad genera un proceso inflamatorio en el cerebro que lleva a la inhibición de la señalización de insulina y leptina en el hipotálamo, exacerbando el desarrollo de obesidad (Jais y Brüning, 2017). Así mismo, se ha visto que la inhibición de la señalización de JNK o IKK/NF- κ B en neuronas hipotalámicas disminuye la ganancia de peso y aumenta la sensibilidad a insulina en modelos de obesidad inducida por dieta (Belgardt et al., 2010; Benzler et al., 2013; Sabio y Davis, 2010). Adicionalmente, la inhibición de la inflamación rescata la memoria y el aprendizaje en ratones alimentado con una DAG (Lu et al., 2011). En este sentido, el AE restablece el déficit cognitivo asociado a la obesidad (Gergerlioglu et al., 2016), lo cual sugiere que el AE podría disminuir el proceso inflamatorio en el cerebro generado por la alimentación con una DAG. También se ha observado que el AE disminuye la expresión de IL-1 β y CD69 en el hipocampo, además de prevenir el deterioro cognitivo durante el envejecimiento, aún en ausencia de ruedas de ejercicio (Birch y Kelly, 2019). En este estudio observamos que la exposición al AE por 3 meses disminuye los niveles de JNK, IKK β y NF- κ B en el hipotálamo de ratones alimentados con una DAG, lo cual indica que el AE es capaz de disminuir la inflamación en el hipotálamo.

Diferentes estudios han determinado que los microRNAs también tienen un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio. Se ha visto que la expresión del miR-146 es inducida por señales inflamatorias, y a su vez este microRNA inhibe la respuesta inflamatoria (Martin et al., 2020; Taganov et al., 2006). En el cerebro, el miR-146 se expresa mayormente en microglía y se ha determinado que su expresión se encuentra alterada en diferentes enfermedades neurodegenerativas y modelos de daño cerebral (Fan et al., 2020; Martin et al., 2020). Otros estudios han reportado que la expresión del miR-146 disminuye en el cerebro en modelos de obesidad y diabetes (Maldonado-Avilés et al., 2018; Xie et al., 2018), aunque se sabe que su expresión aumenta en el tejido adiposo de ratones alimentados con una DAG (Javidan et al., 2019). Adicionalmente, se ha reportado que el AE aumenta la expresión del miR-146 y disminuye la expresión de genes involucrados en vías inflamatorias en un modelo murino de Alzheimer (Nakano et al., 2020). En nuestro modelo experimental observamos que la expresión del miR-146a aumenta en el hipotálamo de los ratones DAG AN, y que su expresión disminuye en los ratones que estuvieron 1 mes en el AE. Esto sugiere que, en el hipotálamo, la expresión del miR-146 podría estar siendo regulado principalmente por señales inflamatorias. Dado estos antecedentes, faltaría determinar el papel del miR-146 en la disfunción hipotalámica asociada a la obesidad e identificar el tipo celular en el cual estaría actuando principalmente.

Dentro de los microRNAs que se ha identificado que pueden regular el proceso inflamatorio, observamos que la exposición al AE por 3 meses aumentó los niveles del miR-223 en el hipotálamo. Diferentes estudios han determinado que el miR-223 inhibe componentes importantes de vías de señalización inflamatorias, entre ellos a NLRP3, IKK α y STAT3 (Bauernfeind et al., 2012; Chen et al., 2012; Li et al., 2010) (Figura 24). Estos antecedentes correlacionan con la disminución en marcadores inflamatorios que observamos en el hipotálamo de los ratones DAG AE 3M. En macrófagos se ha visto que la expresión del miR-223 es regulada negativamente por señales inflamatorias, favoreciendo la activación M1 de macrófagos y la

liberación de citocinas inflamatorias (Chen et al., 2012). Adicionalmente, el ratón carente del miR-223 presenta una exacerbación en el desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones alimentados con una DAG, mediado por un aumento en el proceso inflamatorio en el tejido adiposo (Zhuang et al., 2012). En el cerebro se ha observado que la sobreexpresión del miR-223 tiene un efecto neuroprotector en modelos de isquemia, daño cerebral y esclerosis múltiple (Harraz et al., 2012; Morquette et al., 2019). También se ha visto que la expresión del miR-223 en el hipocampo aumenta con el ejercicio aeróbico, lo cual correlaciona con la disminución de diferentes marcadores inflamatorios en un modelo de estrés (Qu et al., 2020). Estos resultados nos indican que el miR-223 tiene un papel importante en la regulación de la inflamación en diferentes modelos, lo cual recalca la importancia de estudiar el impacto del miR-223 en la función hipotalámica para determinar su efecto en regulación del balance energético.

La inflamación asociada a la obesidad altera diferentes procesos celulares en el hipotálamo, aparte de la vía de señalización de insulina y leptina, promoviendo la neurodegeneración e inhibiendo la neurogénesis (Li et al., 2012; Purkayastha y Cai, 2013). Adicionalmente, se ha visto que la implantación de células troncales neurales hipotalámicas deficientes de IKK β aumenta la neurogénesis y la diferenciación hacia neuronas POMC+; reduciendo el peso corporal, la ingesta de alimento, al igual que la intolerancia a la glucosa y los niveles de insulina en ratones alimentados con una DAG (Li et al., 2014). En nuestro análisis de enriquecimiento de vías con los blancos predichos de los microRNAs del clúster 3, encontramos diferentes vías asociadas a la neurogénesis y diferenciación neuronal (guiado axonal, señalización de Wnt, vías de pluripotencial). Esto sugiere que los microRNAs encontrados en este estudio podrían estar regulando la proliferación y diferenciación de células troncales o precursores neurales. Dentro de las vías enriquecidas para los blancos de los microRNAs sobre expresados por el AE (clúster 2), encontramos vías relacionadas con procesos de muerte celular; como las vías de señalización de p53 y de apoptosis, sugiriendo que el AE también podría estar promoviendo la supervivencia neuronal. De forma interesante, nosotros reportamos que el nivel de expresión de *Pomc* y *Cart* aumenta en los ratones alimentados con una DAG que fueron expuestos al AE durante 1 o 3 meses respectivamente, lo que correlaciona con la disminución en la ingesta y un aumento en la tolerancia a la glucosa observado en estos ratones. Estos resultados sugieren que el AE podría prevenir la neurodegeneración o promover la neurogénesis de neuronas anorexigénicas como parte del mecanismo para mediar el restablecimiento del balance energético en ratones obesos, lo cual faltaría determinar.

Foxo1 es un mediador importante de la vía de señalización de insulina en el hipotálamo, donde regula la expresión de genes orexigénicos y anorexigénicos (Kim et al., 2006). Nosotros observamos que los niveles proteicos de Foxo1 se encontraban elevados en los ratones que fueron expuestos por un mes al AE, y que este aumento no se mantuvo después de tres meses en el AE. Esto correlaciona con la expresión de los microRNAs miR-96 y miR-182 que son reguladores negativos de Foxo1 (Figura 24), cuya expresión disminuye en el grupo DAG AE 1M. Aun con el aumento en los niveles de Foxo1, se observó que la expresión de *Pomc* estaba aumentada en el hipotálamo de los ratones DAG AE 1M. Dado estos resultados,

faltaría determinar el estado de activación de Foxo1 y su actividad transcripcional en nuestras condiciones experimentales.

BDNF ha sido ampliamente estudiado por su papel en el sistema nervioso central, donde se ha determinado que puede regular la supervivencia, proliferación y diferenciación neuronal (Numakawa et al., 2018). Dentro del hipotálamo, se ha visto que BDNF forma parte del circuito que regula el balance energético siendo un mediador de la señalización del receptor MC4R e inhibiendo la ingesta de alimento (Bariohay et al., 2005; Unger et al., 2007; Xu et al., 2003a). Así mismo, una disminución en los niveles de BDNF o de su receptor se han asociado con el desarrollo de hiperfagia y obesidad en humanos y ratones (Rosas-Vargas et al., 2011; Unger et al., 2007). Estudios anteriores han determinado que el AE aumenta la expresión de BDNF en diferentes regiones del cerebro, incluyendo el hipotálamo, y que BDNF media gran parte de los efectos benéficos atribuidos al AE (Bakos et al., 2009; Cao et al., 2011; Mainardi et al., 2010; Xiao et al., 2019). En nuestro estudio determinamos que la exposición al AE por un mes aumenta los niveles de BDNF maduro, mientras que el precursor no procesado de BDNF se encuentra disminuido. Estos datos correlacionan con estudios anteriores donde han visto que el AE favorece la maduración de BDNF (Cao et al., 2014). Adicionalmente, este aumento en BDNF maduro correlaciona con los niveles del miR-182 y miR-151-5p, cuya expresión se encuentra disminuida en los ratones que fueron habitados durante 1 mes en el AE. Ya se ha caracterizado previamente que el miR-182 puede regular negativamente la expresión de BDNF (Li et al., 2016), mientras que el papel del miR-151-5p no había sido caracterizado hasta este estudio. Aun así, observamos que el aumento de BDNF no se mantuvo después de 3 meses en el AE, lo cual correlaciona con un aumento en la expresión del miR-182. Estos resultados nos indican que BDNF estarían siendo regulado a diferentes niveles por el AE, y faltaría comprobar si existen otros microRNAs que estuvieran involucrados en esta regulación.

Hay mucha evidencia acerca de los efectos benéficos del ambiente enriquecido en el sistema nervioso, al igual que en diferentes modelos de patologías en ratas y ratones. Sin embargo, trasladar lo que se sabe en modelos murinos a la clínica no ha sido sencillo. Algunos estudios han logrado adaptar los diferentes componentes del AE (incluyendo la estimulación física, cognitiva, social y somatosensorial) a estudios clínicos para el tratamiento de personas con infarto cerebral, desórdenes del neurodesarrollo, deterioro cognitivo asociado a la edad, y enfermedades neurodegenerativas (Ball et al., 2019; Clemenson et al., 2020; McDonald et al., 2018; Pradhan, 2019). Se ha visto que el AE aumenta la participación en actividades físicas, sociales y cognitivas, además de que mejora el desempeño motor y disminuye la depresión y ansiedad en pacientes en recuperación de infarto cerebral (Janssen et al., 2014; Rosbergen et al., 2017; Vive et al., 2020). Adicionalmente, en niños con autismo el AE puede mejorar el desempeño cognitivo y disminuir los síntomas asociados al autismo (Woo y Leon, 2013; Woo et al., 2015). Estos antecedentes nos muestran que el AE también podría ser adaptado para ser incluido en los tratamientos actuales utilizados para combatir las alteraciones metabólicas en pacientes con obesidad y diabetes tipo II.

CONCLUSIONES

Validamos el modelo de obesidad inducida por la alimentación de una dieta alta en grasa en ratón, donde observamos un aumento en la ganancia de peso y en la adiposidad, esteatosis hepática, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, además de un proceso inflamatorio en el tejido adiposo caracterizado por un aumento en el reclutamiento de células inmunes y un aumento en los niveles de citocinas inflamatorias.

Determinamos que el ambiente enriquecido disminuyó los niveles de glucosa en sangre en ayuno, aumento la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa que previamente presentaban alteraciones metabólicas.

En el hígado observamos que el ambiente enriquecido aumento la señalización de insulina y disminuyó la acumulación de lípidos en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

El ambiente enriquecido también disminuyó el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo epididimal y los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF, IL-1 β e IL-6, además de que aumentó la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. También observamos un aumento en marcadores de lipólisis y de browning en el tejido adiposo en los ratones que fueron expuestos a un ambiente enriquecido y alimentados con una dieta alta en grasa.

Determinamos que la expresión de microRNAs en el hipotálamo fue alterada por la alimentación de una dieta alta en grasa y por la exposición a un ambiente enriquecido, donde observamos que el ambiente enriquecido redujo la expresión de microRNAs que habían aumentado en respuesta al consumo de una dieta alta en grasa.

Validamos la regulación de la 3'UTR de *Foxo1* por el miR-96, al igual que la regulación de la 3'UTR de *Bdnf* por los microRNAs miR-182 y miR-151, y observamos que en nuestras condiciones experimentales había una correlación inversa entre los niveles de estos microRNAs y los niveles proteicos de BDNF y *Foxo1*.

Observamos que el ambiente enriquecido aumentó los niveles de diferentes marcadores anorexigénicos como BDNF, *Pomc* y *Cart* en el hipotálamo de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa. También determinamos que la alimentación con una dieta alta en grasa disminuyó la señalización de insulina en el hipotálamo. Finalmente, observamos que el ambiente enriquecido redujo los niveles de proteínas involucradas en la señalización inflamatoria en el hipotálamo de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

PERSPECTIVAS

- Observamos que la exposición por 1 mes al ambiente enriquecido tiene efectos en el metabolismo de la glucosa, señalización de insulina y en el proceso inflamatorio en el tejido adiposo, por lo que resulta interesante realizar experimentos a tiempos más cortos para determinar los cambios propiciados por el AE que suceden primero.
- El AE aumentó la expresión de marcadores de lipólisis y de browning en el tejido adiposo, por lo que faltaría determinar si el AE enriquecido aumenta el gasto de energía utilizando jaulas metabólicas
- Dado que observamos que la inflamación en el tejido adiposo fue disminuida en los ratones que fueron habitados en el AE, además de que aumentaron los niveles de citocinas anti-inflamatorias, nos gustaría determinar si el AE altera regula el estado de activación de las células del sistema inmune en el tejido adiposo
- Se han identificado diferentes vías por las cuales el AE regula la diferenciación y activación de células del sistema inmune, por lo que faltaría determinar si el AE reduce la inflamación en los ratones alimentados con una DAG a través de alguna de estas vías o por otro mecanismo.
- Dentro del análisis de enriquecimiento de vías para los microRNAs que identificamos en este estudio observamos un gran número de blancos en la vía de señalización de insulina que no han sido probados, por lo que nos gustaría validar algunas de estas interacciones predichas y el efecto que tienen en la vía de señalización de insulina.
- El miR-223 regula los niveles de varias proteínas inflamatorias, además de que observamos que fue el microRNA con un mayor aumento de expresión en respuesta al AE, por lo que sería interesante determinar si la sobreexpresión del miR-223 en el hipotálamo en el modelo de obesidad inducida por dieta recapitula los efectos del AE en el metabolismo.
- Nos interesaría determinar si el AE regula el número de neuronas en el hipotálamo ya sea inhibiendo la muerte neuronal o aumentando la neurogénesis, dado que observamos un enriquecimiento en vías de señalización involucradas en estos procesos en los blancos de los microRNAs, además que se ha observado que disminuir la inflamación asociada a la obesidad previene la muerte neuronal y rescata la neurogénesis adulta.
- Trabajar en la estandarización del modelo de ambiente enriquecido para poder optimizar su efecto en el modelo de obesidad inducido por dieta.

REFERENCIAS

- Abou-Ismaïl, U. A.** (2011). Are the effects of enrichment due to the presence of multiple items or a particular item in the cages of laboratory rat? *Appl. Anim. Behav. Sci.* **134**, 72–82.
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J.** (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–42.
- Aceves-Martins, M., Llauradó, E., Tarro, L., Solà, R. and Giralt, M.** (2016). Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: Challenges and opportunities. *Glob. Health Action* **9**,.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. and Bartel, D. P.** (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **4**, 1–38.
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. and White, M. F.** (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* **275**, 9047–54.
- 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 1531–7.
- Ahima, R. S. and Osei, S. Y.** (2004). Leptin signaling. *Physiol. Behav.* **81**, 223–41.
- Ahrén, B. and Pacini, G.** (2002). Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **283**, 738–744.
- Alboni, S., Cervia, D., Sugama, S. and Conti, B.** (2010). Interleukin 18 in the CNS. *J. Neuroinflammation* **7**, 9.
- 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. *Neurobiol. Learn. Mem.* **92**, 381–90.
- Ali, S., Liu, X., Queen, N. J., Patel, R. S., Wilkins, R. K., Mo, X. and Cao, L.** (2019). Long-term environmental enrichment affects microglial morphology in middle age mice. *Aging (Albany, NY)*. **11**, 2388–2402.
- Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloro, S. M., Yawe, J. C., Shen, Y., Czech, M. P. and Aouadi, M.** (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* **19**, 162–171.
- Amar, L., Benoit, C., Beaumont, G., Vacher, C. M., Crepin, D., Taouis, M. and Baroin-Tourancheau, a** (2012). MicroRNA expression profiling of hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei from single rats using Illumina sequencing technology. *J. Neurosci. Methods* **209**, 134–43.
- Ameres, S. L. and Zamore, P. D.** (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–488.
- Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H. and Inui, A.** (2013). The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front. Neurosci.* **7**, 51.
- Anders, S. and Huber, W.** (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106.
- 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. *Nat. Med.* **11**, 191–8.
- Arner, P. and Kulyté, A.** (2015). MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 276–288.
- 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 Res.* **13**, 415–28.
- Babon, J. J. and Nicola, N. A.** (2012). The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. *Growth Factors* **30**, 207–19.
- Bak, M., Silaharoglu, A., Møller, M., Christensen, M., Rath, M. F., Skryabin, B., Tommerup, N. and Kauppinen, S.** (2008). MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* **14**, 432–44.
- 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**, 788–97.
- Ball, N. J., Mercado, E. and Orduña, I.** (2019). Enriched environments as a potential treatment for developmental disorders: A critical assessment. *Front. Psychol.* **10**, 1–12.
- Bao, A.-M., Meynen, G. and Swaab, D. F.** (2008). The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res. Rev.* **57**, 531–53.
- Barak, B., Shvarts-Serebro, I., Modai, S., Gilam, A., Okun, E., Michaelson, D. M., Mattson, M. P., Shomron, N. and Ashery, U.** (2013). Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNAs in mouse models. *Transl. Psychiatry* **3**, e304.
- Bariohay, B., Lebrun, B., Moyses, E. and Jean, A.** (2005). Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology* **146**, 5612–20.
- Barnes, M. A., Carson, M. J. and Nair, M. G.** (2015). Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine* **72**, 210–9.
- Barquera, S., Hernández-Barrera, L., Trejo-Valdivia, B., Shamah, T., Campos-Nonato, I. and Rivera-Dommarco, J.** (2020). Obesidad en México, prevalencia y tendencias en adultos. *Ensanut 2018-19. Salud Publica Mex.* **62**, 682–692.
- Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. and Niedobitek, G.** (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One* **8**, e80908.
- Bashan, N., Dorfman, K., Tarnovskii, 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**, 2955–62.
- 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. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4–12.
- Bauernfeind, F., Rieger, A., Schildberg, F. a, Knolle, P. a, Schmid-Burgk, J. L. and Hornung, V.** (2012). NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J. Immunol.* **189**, 4175–81.
- Belgardt, B. F., Okamura, T. and Brüning, J. C.** (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *J. Physiol.* **587**, 5305–14.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6028–33.
- Benoit, C., Ould-Hamouda, H., Crepin, D., Gertler, A., Amar, L. and Taouis, M.** (2013). Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J. Endocrinol.* **218**, 35–47.
- Benzler, J., Ganjam, G. K., Legler, K., Stöhr, 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. *J. Neuroendocrinol.* **25**, 446–54.
- Birch, A. M. and Kelly, Á. M.** (2019). Lifelong environmental enrichment in the absence of exercise protects the brain from age-related cognitive decline. *Neuropharmacology* **145**, 59–74.
- Blüher, M.** (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 288–298.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Boström, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z., et al.** (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463–8.
- Boutens, L. and Stienstra, R.** (2016). Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* **59**, 879–94.
- Bradley, R. L., Jeon, J. Y., Liu, F.-F. and Maratos-Flier, E.** (2008). Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *AJP Endocrinol. Metab.* **295**, E586–E594.
- Brenes, J. C., Lackinger, M., Höglinger, G. U., Schratz, G., Schwarting, R. K. W. and Wöhr, M.** (2016). Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. *J. Comp. Neurol.* **524**, 1586–1607.
- Brestoff, J. R. and Artis, D.** (2015). Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease.

Cell **161**, 146–160.

- Buckman, L. B., Hasty, A. H., Flaherty, D. K., Buckman, C. T., Thompson, M. M., Matlock, B. K., Weller, K. and Ellacott, K. L. J.** (2014). Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain. Behav. Immun.* **35**, 33–42.
- Burke, D. A., Magnuson, D. S. K., Nunn, C. D., Fentress, K. G., Wilson, M. L., Shum-Siu, A. H., Moore, M. C., Turner, L. E., King, W. W. and Onifer, S. M.** (2007). Use of environmentally enriched housing for rats with spinal cord injury: the need for standardization. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **46**, 34–41.
- Cai, D.** (2013). Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 40–7.
- 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. *Nat. Med.* **11**, 183–90.
- Camell, C. D., Sander, J., Spadaro, O., Lee, A., Nguyen, K. Y., Wing, A., Goldberg, E. L., Youm, Y.-H., Brown, C. W., Elsworth, J., et al.** (2017). Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature* **550**, 119–123.
- 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 Metab.* **14**, 324–338.
- Cao, W., Duan, J., Wang, X., Zhong, X., Hu, Z., Huang, F., Wang, H., Zhang, J., Li, F., Zhang, J., et al.** (2014). Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behav. Brain Res.* **265**, 76–83.
- 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 Lett.* **500**, 119–24.
- Castanon, N., Lasselín, J. and Capuron, L.** (2014). Neuropsychiatric comorbidity in obesity: Role of inflammatory processes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 1–9.
- Chabry, J., Nicolas, S., Cazareth, J., Murrís, E., Guyon, A., Glaichenhaus, N., Heurteaux, C. and Petit-Paitel, A.** (2015). Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. *Brain. Behav. Immun.* **50**, 275–287.
- Chakraborty, C., Doss, C. G. P., Bandyopadhyay, S. and Agoramoorthy, G.** (2014). Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: Micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **5**, 697–712.
- Chen, A., Mumick, S., Zhang, C., Lamb, J., Dai, H., Weingarh, D., Mudgett, J., Chen, H., MacNeil, D. J., Reitman, M. L., et al.** (2005). Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes. Res.* **13**, 1311–20.
- Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., Song, Y., Lai, L., Han, Q., Cao, X. and Wang, Q.** (2012). Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 β production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS One* **7**, e42971.
- Choi, J. W., Kang, S. M., Lee, Y., Hong, S. H., Sanek, N. A., Young, W. S. and Lee, H. J.** (2013). MicroRNA profiling in the mouse hypothalamus reveals oxytocin-regulating microRNA. *J. Neurochem.* **126**, 331–337.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- 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. *J. Lipid Res.* **46**, 2347–55.
- Clemenson, G. D., Stark, S. M., Rutledge, S. M. and Stark, C. E. L.** (2020). Enriching hippocampal memory function in older adults through video games. *Behav. Brain Res.* **390**, 112667.
- 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. *Physiol. Behav.* **81**, 243–8.

- Cox, A. J., West, N. P. and Cripps, A. W.** (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **3**, 207–215.
- Crépin, D., Benomar, Y., Riffault, L., Amine, H., Gertler, A. and Taouis, M.** (2014). The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Mol. Cell. Endocrinol.* **384**, 1–11.
- Davis, C. J., Bohnet, S. G., Meyerson, J. M. and Krueger, J. M.** (2007). Sleep loss changes microRNA levels in the brain: a possible mechanism for state-dependent translational regulation. *Neurosci. Lett.* **422**, 68–73.
- de Luca, C. and Olefsky, J. M.** (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* **582**, 97–105.
- 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**, 4192–9.
- Derghal, A., Djelloul, M., Airault, C., Pierre, C., Dallaporta, M., Troadec, J.-D., Tillement, V., Tardivel, C., Bariohay, B., Trouslard, J., et al.** (2015). Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–10.
- Díaz de León-Guerrero, S.** (2013). Efecto de un Paradigma de Ambiente Enriquecido en un Modelo Murino de Obesidad y Diabetes Tipo.
- Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H. and Zhang, X.** (2013). MicroRNA: Function, detection, and bioanalysis. *Chem. Rev.* **113**, 6207–6233.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. and Gretz, N.** (2011). MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* **44**, 839–847.
- Ehshes, J. A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J. A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M. K. J., Biollaz, G., et al.** (2007). Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* **56**, 2356–70.
- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A. and Abed, Y.** (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch. Med. Sci.* **13**, 851–863.
- Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D. S.** (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* **5**, R1.
- Ergen, F. B., Cosan, D. T., Kandemir, T., Dag, İ., Mutlu, F. and Cosan, T. E.** (2021). An Enriched Environment Leads to Increased Synaptic Plasticity-Associated miRNA Levels after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **30**, 1–11.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J. and Paquot, N.** (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **105**, 141–150.
- Faherty, C. J., Kerley, D. and Smeyne, R. J.** (2003). A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **141**, 55–61.
- Falkenberg, T., Mohammed, A. K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B. and Lindfors, N.** (1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci. Lett.* **138**, 153–156.
- Fan, W., Liang, C., Ou, M., Zou, T., Sun, F., Zhou, H. and Cui, L.** (2020). MicroRNA-146a Is a Wide-Reaching Neuroinflammatory Regulator and Potential Treatment Target in Neurological Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 1–14.
- Fantuzzi, G.** (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 911–919.
- Fares, R. P., Belmeguenai, A., Sanchez, P. E., Kouchi, H. Y., Bodennec, J., Morales, A., Georges, B., Bonnet, C., Bouvard, S., Sloviter, R. S., et al.** (2013). Standardized Environmental Enrichment Supports Enhanced Brain Plasticity in Healthy Rats and Prevents Cognitive Impairment in Epileptic Rats. *PLoS One* **8**,.
- Farr, S. A., Yamada, K. A., Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Xu, L., Miller, N. E., Banks, W. A. and Morley, J. E.** (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* **149**, 2628–2636.
- Fernández-de Frutos, M., Galán-Chilet, I., Goedeke, L., Kim, B., Pardo-Marqués, V., Pérez-García, A., Herrero, J. I., Fernández-Hernando, C., Kim, J. and Ramírez, C. M.** (2019). MicroRNA 7 impairs insulin signaling and regulates A beta levels through posttranscriptional regulation of the insulin receptor. *Mol. Cell. Biol.* **39**, 1–19.
- 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. *Mol. Neurobiol.* **13**, 155–83.
- Fourrier, C., Bosch-Bouju, C., Boursereau, R., Sauvart, J., Aubert, A., Capuron, L., Ferreira, G., Layé, S. and Castanon, N.** (2019). Brain tumor necrosis factor- α mediates anxiety-like behavior in a mouse model of severe obesity. *Brain. Behav. Immun.* **77**, 25–36.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. and Bartel, D. P.** (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105.
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S. and Rodríguez, A.** (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr. Res. Rev.* **27**, 63–93.
- Fu, X., Dong, B., Tian, Y., Lefebvre, P., Meng, Z., Wang, X., Pattou, F., Han, W., Wang, X., Lou, F., et al.** (2015). MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *J. Clin. Invest.* **125**, 2497–509.
- 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 48115–21.
- Gaudet, A. D., Fonken, L. K., Gushchina, L. V., Aubrecht, T. G., Maurya, S. K., Periasamy, M., Nelson, R. J. and Popovich, P. G.** (2016). miR-155 Deletion in Female Mice Prevents Diet-Induced Obesity. *Sci. Rep.* **6**, 22862.
- Gebert, L. F. R. and MacRae, I. J.** (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 21–37.
- Geibel, M., Badurek, S., Horn, J. M., Vatanashevanopakorn, C., Koudelka, J., Wunderlich, C. M., Brönneke, H. S., Wunderlich, F. T. and Minichiello, L.** (2014). Ablation of TrkB signalling in CCK neurons results in hypercortisolism and obesity. *Nat. Commun.* **5**, 3427.
- Gergerlioglu, H. S., Oz, M., Demir, E. A., Nurullahoglu-Atalik, K. E. and Yerlikaya, F. H.** (2016). Environmental enrichment reverses cognitive impairments provoked by Western diet in rats: Role of corticosteroid receptors. *Life Sci.* **148**, 279–85.
- Giannogonas, P., Apostolou, A., Manousopoulou, A., Theocharis, S., MacAri, S. A., Psarras, S., Garbis, S. D., Pothoulakis, C. and Karalis, K. P.** (2016). Identification of a novel interaction between corticotropin releasing hormone (Crh) and macroautophagy. *Sci. Rep.* **6**, 1–11.
- 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.
- Gomez, A. M., Altomare, D., Sun, W. L., Midde, N. M., Ji, H., Shtutman, M., Turner, J. R., Creek, K. E. and Zhu, J.** (2016). Prefrontal microRNA-221 mediates environmental enrichment-induced increase of locomotor sensitivity to nicotine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, 1–12.
- Grégoire, C.-A., Bonenfant, D., Le Nguyen, A., Aumont, A. and Fernandes, K. J. L.** (2014). Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. *PLoS One* **9**, e86237.
- Gregor, M. F. and Hotamisligil, G. S.** (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–45.
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engle, P., Lim, L. P. and Bartel, D. P.** (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105.
- Griñan-Ferré, C., Puigoriol-Illamola, D., Palomera-ávalos, V., Pérez-Cáceres, D., Companys-Aleman, J., Camins, A., Ortuño-Sahagún, D., Teresa Rodrigo, M. and Pallàs, M.** (2016). Environmental enrichment modified epigenetic mechanisms in SAMP8 mouse hippocampus by reducing oxidative stress and inflammaging and achieving neuroprotection. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 1–12.
- Gubert, C. and Hannan, A. J.** (2019). Environmental enrichment as an experience-dependent modulator of social plasticity and cognition. *Brain Res.* **1717**, 1–14.
- Guillemot-Legris, O. and Muccioli, G. G.** (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci.* **40**, 237–253.
- Guillemot-Legris, O., Masquelier, J., Everard, A., Cani, P. D., Alhouayek, M. and Muccioli, G. G.** (2016). High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–11.
- Gukovsky, I., Li, N., Todoric, J., Gukovskaya, A. and Karin, M.** (2013). Inflammation, autophagy, and obesity: Common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer.

Gastroenterology **144**, 1199–1209.

- Gurfein, B. T., Hasdemir, B., Milush, J. M., Touma, C., Palme, R., Nixon, D. F., Darcel, N., Hecht, F. M. and Bhargava, A.** (2017). Enriched environment and stress exposure influence splenic B lymphocyte composition. *PLoS One* **12**, e0180771.
- Ha, M. and Kim, V. N.** (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524.
- Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A. and Davis, R. J.** (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* **339**, 218–22.
- Hardy, O. T., Perugini, R. A., Nicoloso, S. M., Gallagher-Dorval, K., Puri, V., Straubhaar, J. and Czech, M. P.** (2012). Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **7**, 60–7.
- Hargrave, S. L., Davidson, T. L., Zheng, W. and Kinzig, K. P.** (2016). Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. *Behav. Neurosci.* **130**, 123–35.
- Harms, M. and Seale, P.** (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252–63.
- Harraz, M. M., Eacker, S. M., Wang, X., Dawson, T. M. and Dawson, V. L.** (2012). MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18962–7.
- Harvey, J. and Ashford, M. L. J.** (2003). Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* **44**, 845–854.
- He, L. and Hannon, G. J.** (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–31.
- Heneghan, H. M., Miller, N. and Kerin, M. J.** (2010). Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obes. Rev.* **11**, 354–361.
- Hill, A. A., Reid Bolus, W. and Hasty, A. H.** (2014). A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol. Rev.* **262**, 134–152.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M. and Hotamisligil, G. S.** (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333–6.
- Hosseiny, S., Pietri, M., Petit-Paitel, A., Zarif, H., Heurteaux, C., Chabry, J. and Guyon, A.** (2014). Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. *Brain Struct. Funct.*
- Hotamisligil, G. S.** (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–7.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. and Spiegelman, B. M.** (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409–15.
- Hsu, S. Da, Tseng, Y. T., Shrestha, S., Lin, Y. L., Khaleel, A., Chou, C. H., Chu, C. F., Huang, H. Y., Lin, C. M., Ho, S. Y., et al.** (2014). MiRTarBase update 2014: An information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **42**, 78–85.
- Hüttenrauch, M., Salinas, G. and Wirths, O.** (2016). Effects of Long-Term Environmental Enrichment on Anxiety, Memory, Hippocampal Plasticity and Overall Brain Gene Expression in C57BL6 Mice. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 1–11.
- Iacomino, G. and Siani, A.** (2017). Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr.* **12**, 1–16.
- 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. *Exp. Neurol.* **164**, 45–52.
- Iskandar, K., Cao, Y., Hayashi, Y., Nakata, M., Takano, E., Yada, T., Zhang, C., Ogawa, W., Oki, M., Chua, S., et al.** (2010). PDK-1/FoxO1 pathway in POMC neurons regulates Pomc expression and food intake. *AJP Endocrinol. Metab.* **298**, E787–E798.
- Jais, A. and Brüning, J. C.** (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 24–32.
- Jankowsky, J. L., Melnikova, T., Fadale, D. J., Xu, G. M., Slunt, H. H., Gonzales, V., Younkin, L. H., Younkin, S. G., Borchelt, D. R. and Savonenko, A. V.** (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **25**, 5217–24.
- Janssen, H., Ada, L., Bernhardt, J., McElduff, P., Pollack, M., Nilsson, M. and Spratt, N. J.** (2014). An

- enriched environment increases activity in stroke patients undergoing rehabilitation in a mixed rehabilitation unit: A pilot non-randomized controlled trial. *Disabil. Rehabil.* **36**, 255–262.
- Javidan, A., Jiang, W., Okuyama, M., Thiagarajan, D., Yang, L., Moorlegghen, J. J., Muniappan, L. and Subramanian, V.** (2019). miR-146a Deficiency Accelerates Hepatic Inflammation Without Influencing Diet-induced Obesity in Mice. *Sci. Rep.* **9**, 1–14.
- Jeffers, M. S. and Corbett, D.** (2018). Synergistic effects of enriched environment and task-specific reach training on poststroke recovery of motor function. *Stroke* **49**, 1496–1503.
- Jensen, V. S., Hvid, H., Damgaard, J., Nygaard, H., Ingvorsen, C., Wulff, E. M., Lykkesfeldt, J. and Fledelius, C.** (2018). Dietary fat stimulates development of NAFLD more potently than dietary fructose in Sprague-Dawley rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **10**, 1–13.
- Jeon, B. T., Jeong, E. A., Shin, H. J., Lee, Y., Lee, D. H., Kim, H. J., Kang, S. S., Cho, G. J., Choi, W. S. and Roh, G. S.** (2012). Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **61**, 1444–1454.
- 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. *J. Biol. Chem.* **287**, 13561–71.
- Jiménez-Jacinto, V., Sanchez-Flores, A. and Vega-Alvarado, L.** (2019). Integrative Differential Expression Analysis for Multiple EXperiments (IDEAMEX): A Web Server Tool for Integrated RNA-Seq Data Analysis. *Front. Genet.* **10**, 1–16.
- Jin, Y., Tymen, S. D., Chen, D., Fang, Z. J., Zhao, Y., Dragas, D., Dai, Y., Marucha, P. T. and Zhou, X.** (2013). MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing. *PLoS One* **8**, e64434.
- Jocken, J. W. E. and Blaak, E. E.** (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* **94**, 219–230.
- Johansson, B. B. and Belichenko, P. V.** (2002). Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 89–96.
- Jovičić, A., Roshan, R., Moiso, N., Pradervand, S., Moser, R., Pillai, B. and Luthi-Carter, R.** (2013). Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *Ann. Intern. Med.* **158**, 5127–5137.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., et al.** (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **281**, 26602–14.
- 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. *J. Clin. Invest.* **116**, 1494–505.
- Karczewski, J., Zielińska, A., Staszewski, R., Eder, P., Dobrowolska, A. and Souto, E. B.** (2022). Obesity and the Brain. *Int. J. Mol. Sci.* **23**,.
- Karimi, S. A., Salehi, I., Komaki, A., Sarihi, A., Zarei, M. and Shahidi, S.** (2013). Effect of high-fat diet and antioxidants on hippocampal long-term potentiation in rats: An in vivo study. *Brain Res.* **1539**, 1–6.
- Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. and Segal, E.** (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* **39**, 1278–1284.
- Keymoradzadeh, A., Hedayati Ch, M., Abedinzade, M., Gazor, R., Rostampour, M. and Taleghani, B. K.** (2020). Enriched environment effect on lipopolysaccharide-induced spatial learning, memory impairment and hippocampal inflammatory cytokine levels in male rats. *Behav. Brain Res.* **394**, 112814.
- Kim, J. K., Fillmore, J. J., Sunshine, M. J., Albrecht, B., Higashimori, T., Kim, D., Liu, Z., Soos, T. J., Cline, G. W., O'Brien, W. R., et al.** (2004). PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **114**, 823–7.
- 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. *Nat. Neurosci.* **9**, 901–6.

- Kim, D., Kim, J., Yoon, J. H., Ghim, J., Yea, K., Song, P., Park, S., Lee, A., Hong, C.-P., Jang, M. S., et al. (2014). CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* **57**, 1456–65.
- 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. *Nat. Med.* **12**, 534–40.
- Kleinridders, A., Schenten, D., Könner, a C., Belgardt, B. F., Mauer, J., Okamura, T., Wunderlich, F. T., Medzhitov, R. and Brüning, J. C. (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab.* **10**, 249–59.
- Klötting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., Schön, M. R., Kern, M., Stumvoll, M. and Blüher, M. (2010). Insulin-sensitive obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E506-15.
- Kohno, D. and Yada, T. (2012). Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides* **46**, 315–9.
- Konieczna, J., García, A. P., Sánchez, J., Palou, M., Palou, A. and Picó, C. (2013). Oral leptin treatment in suckling rats ameliorates detrimental effects in hypothalamic structure and function caused by maternal caloric restriction during gestation. *PLoS One* **8**, e81906.
- Koyama, Y. and Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 55–64.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014). MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, 68–73.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., Da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**, 495–500.
- 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**, 127–32.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401–14.
- Langdon, K. D. and Corbett, D. (2012). Improved working memory following novel combinations of physical and cognitive activity. *Neurorehabil. Neural Repair* **26**, 523–532.
- Lechan, R. M. and Fekete, C. (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* **153**, 209–35.
- Lee, H.-J., Palkovits, M. and Young, W. S. (2006). miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15669–74.
- Leggio, M. G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F. and Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* **163**, 78–90.
- Leininger, G. M. (2011). Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. *Physiol. Behav.* **104**, 572–81.
- Li, T., Morgan, M. J., Choksi, S., Zhang, Y., Kim, Y. and Liu, Z. (2010). MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat. Immunol.* **11**, 799–805.
- Li, J., Tang, Y. and Cai, D. (2012). IKKβ/NF-κB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 999–1012.
- Li, J., Tang, Y., Purkayastha, S., Yan, J. and Cai, D. (2014). Control of obesity and glucose intolerance via building neural stem cells in the hypothalamus. *Mol. Metab.* **3**, 313–24.
- Li, Y., Li, S., Yan, J., Wang, D., Yin, R., Zhao, L., Zhu, Y. and Zhu, X. (2016). MiR-182 (microRNA-182) suppression in the hippocampus evokes antidepressant-like effects in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **65**, 96–103.
- Lindsay, M. a (2008). microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* **29**, 343–51.
- Liu, L., Li, H., Li, J., Zhong, H., Zhang, H., Chen, J. and Xiao, T. (2011). miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 31–8.
- Liu, X., Zhu, Z., Kalyani, M., Janik, J. M. and Shi, H. (2014a). Effects of energy status and diet on Bdnf

- expression in the ventromedial hypothalamus of male and female rats. *Physiol. Behav.* **130**, 99–107.
- Liu, X., Mcmurphy, T., Xiao, R., Slater, A., Huang, W. and Cao, L.** (2014b). Hypothalamic gene transfer of BDNF inhibits breast cancer progression and metastasis in middle age obese mice. *Mol. Ther.* **22**, 1275–1284.
- Liu, J., Zheng, J., Xu, Y., Cao, W., Wang, J., Wang, B., Zhao, L., Zhang, X. and Liao, W.** (2021). Enriched Environment Attenuates Pyroptosis to Improve Functional Recovery After Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Front. Aging Neurosci.* **13**,.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8.
- Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z. and Shan, Q.** (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 1658–67.
- Lumeng, C. N. and Saltiel, A. R.** (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **121**, 2111–7.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R.** (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–84.
- Ma, X., Becker Buscaglia, L. E., Barker, J. R. and Li, Y.** (2011). MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 159–66.
- Ma, Y., Yang, H. Z., Dong, B. J., Zou, H. B., Zhou, Y., Kong, X. M. and Huang, Y. R.** (2014). Biphasic regulation of autophagy by miR-96 in prostate cancer cells under hypoxia. *Oncotarget* **5**, 9169–9182.
- Maesako, M., Uemura, K., Kubota, M., Kuzuya, A., Sasaki, K., Asada, M., Watanabe, K., Hayashida, N., Ihara, M., Ito, H., et al.** (2012). Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **33**, 1011.e11–23.
- Mainardi, M., Scabia, G., Vottari, T., Santini, F., Pinchera, A., Maffei, L., Pizzorusso, T. and Maffei, M.** (2010). A sensitive period for environmental regulation of eating behavior and leptin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16673–8.
- Maldonado-Avilés, J. G., Guarnieri, D. J., Zhu, X. and DiLeone, R. J.** (2018). Down-regulation of miRNAs in the brain and development of diet-induced obesity. *Int. J. Dev. Neurosci.* **64**, 2–7.
- 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. *Horm. Behav.* **43**, 281–92.
- Marinho, R., Munõz, V. R., Pauli, L. S. S., Ropelle, E. C. C., de Moura, L. P., Moraes, J. C., Moura-Assis, A., Cintra, D. E., da Silva, A. S. R., Ropelle, E. R., et al.** (2018). Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice. *J. Cell. Physiol.* **234**, 880–890.
- Marino, J. S., Xu, Y. and Hill, J. W.** (2011). Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 275–85.
- Marques-Deak, a, Cizza, G. and Sternberg, E.** (2005). Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol. Psychiatry* **10**, 239–50.
- Martin, N. A., Hyrlov, K. H., Elkjaer, M. L., Thygesen, E. K., Wlodarczyk, A., Elbaek, K. J., Aboo, C., Okarmus, J., Benedikz, E., Reynolds, R., et al.** (2020). Absence of miRNA-146a Differentially Alters Microglia Function and Proteome. *Front. Immunol.* **11**, 1–21.
- McDonald, M. W., Hayward, K. S., Rosbergen, I. C. M., Jeffers, M. S. and Corbett, D.** (2018). Is environmental enrichment ready for clinical application in human post-stroke rehabilitation? *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 1–16.
- McLaughlin, T., Ackerman, S. E., Shen, L. and Engleman, E.** (2017). Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 5–13.
- McMurphy, T., Huang, W., Queen, N. J., Ali, S., Widstrom, K. J., Liu, X., Xiao, R., Siu, J. J. and Cao, L.** (2018). Implementation of environmental enrichment after middle age promotes healthy aging. *Aging (Albany, NY)*. **10**, 1698–1721.
- Meng, Z., Liu, T., Song, Y., Wang, Q., Xu, D., Jiang, J., Li, M., Qiao, J., Luo, X., Gu, J., et al.** (2019). Exposure to an enriched environment promotes the terminal maturation and proliferation of natural killer cells in mice. *Brain. Behav. Immun.* **77**, 150–160.
- Mi, L., Chen, Y., Zheng, X., Li, Y., Zhang, Q., Mo, D. and Yang, G.** (2015). MicroRNA-139-5p suppresses 3T3-L1 preadipocyte differentiation through notch and irs1/pi3k/akt insulin signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1195–1204.

- 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. *J. Neurosci.* **29**, 359–70.
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. a, Pauli, J. R., Romanatto, T., Carnevalheira, J. B., Oliveira, A. L. R., Saad, M. J., et al.** (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* **4**, e5045.
- Morquette, B., Juźwik, C. A., Drake, S. S., Charabati, M., Zhang, Y., Lécuyer, M.-A., Galloway, D. A., Dumas, A., de Faria Junior, O., Paradis-Isler, N., et al.** (2019). MicroRNA-223 protects neurons from degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **142**, 2979–2995.
- Morton, G. J. and Schwartz, M. W.** (2011). Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol. Rev.* **91**, 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**, 289–95.
- Mowers, J., Uhm, M., Reilly, S. M., Simon, J., Leto, D., Chiang, S.-H., Chang, L. and Saltiel, A. R.** (2013). Inflammation produces catecholamine resistance in obesity via activation of PDE3B by the protein kinases IKK ϵ and TBK1. *Elife* **2**, e01119.
- Münzberg, H., Flier, J. S. and Bjørbaek, C.** (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* **145**, 4880–9.
- Muraoka, O., Xu, B., Tsurumaki, T., Akira, S., Yamaguchi, T. and Higuchi, H.** (2003). Leptin-induced transactivation of NPY gene promoter mediated by JAK1, JAK2 and STAT3 in the neural cell lines. *Neurochem. Int.* **42**, 591–601.
- Nakano, M., Kubota, K., Hashizume, S., Kobayashi, E., Chikenji, T. S., Saito, Y. and Fujimiya, M.** (2020). An enriched environment prevents cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by enhancing the secretion of exosomal microRNA-146a from the choroid plexus. *Brain, Behav. Immun. - Heal.* **9**, 100149.
- Nakata, M., Yamamoto, S., Okada, T. and Yada, T.** (2017). AAV-mediated IL-10 gene transfer counteracts inflammation in the hypothalamic arcuate nucleus and obesity induced by high-fat diet. *Neuropeptides* **62**, 87–92.
- Nguyen, D. M. and El-Serag, H. B.** (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **39**, 1–7.
- Nicolas, C. S., Amici, M., Bortolotto, Z. A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G. L. and Peineau, S.** (2013). The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAK-STAT* **2**, e22925.
- Nigi, L., Grieco, G. E., Ventriglia, G., Brusco, N., Mancarella, F., Formichi, C., Dotta, F. and Sebastiani, G.** (2018). MicroRNAs as regulators of insulin signaling: Research updates and potential therapeutic perspectives in type 2 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
- 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. *Nat. Med.* **15**, 914–20.
- Nithianantharajah, J. and Hannan, A. J.** (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 697–709.
- Numakawa, T., Odaka, H. and Adachi, N.** (2018). Actions of Brain-Derived Neurotrophin Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
- O'Brien, P. D., Hinder, L. M., Callaghan, B. C. and Feldman, E. L.** (2017). Neurological consequences of obesity. *Lancet. Neurol.* **16**, 465–477.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H. and Kanehisa, M.** (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 29–34.
- Orr, J. S., Puglisi, M. J., Ellacott, K. L. J., Lumeng, C. N., Wasserman, D. H. and Hasty, A. H.** (2012). Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes* **61**, 2718–2727.
- Ortega, F. J., Mercader, J. M., Catalán, V., Moreno-Navarrete, J. M., Pueyo, N., Sabater, M., Gómez-Ambrosi, J., Anglada, R., Fernández-Formoso, J. A., Ricart, W., et al.** (2013). Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin. Chem.* **59**, 781–792.

- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. and Walsh, K.** (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **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 Metab.* **9**, 35–51.
- Pal, M., Wunderlich, C. M., Spohn, G., Brönneke, H. S., Schmidt-Supprian, M. and Wunderlich, F. T.** (2013). Alteration of JNK-1 Signaling in Skeletal Muscle Fails to Affect Glucose Homeostasis and Obesity-Associated Insulin Resistance in Mice. *PLoS One* **8**, e54247.
- Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I. S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T. and Hatzigeorgiou, A. G.** (2013). DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* **41**, 169–173.
- Park, H.-K. and Ahima, R. S.** (2015). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metab. - Clin. Exp.* **64**, 24–34.
- Pescador, N., Pérez-Barba, M., Ibarra, J. M., Corbatón, A., Martínez-Larrad, M. T. and Serrano-Ríos, M.** (2013). Serum Circulating microRNA Profiling for Identification of Potential Type 2 Diabetes and Obesity Biomarkers. *PLoS One* **8**, 21–23.
- 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. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E1003-12.
- Pradhan, S.** (2019). The use of commercially available games for a combined physical and cognitive challenge during exercise for individuals with Parkinson’s disease—a case series report. *Physiother. Theory Pract.* **35**, 355–362.
- Prado Lima, M. G., Schimidt, H. L., Garcia, A., Daré, L. R., Carpes, F. P., Izquierdo, I. and Mello-Carpes, P. B.** (2018). Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E2403–E2409.
- Purkayastha, S. and Cai, D.** (2013). Disruption of neurogenesis by hypothalamic inflammation in obesity or aging. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 351–6.
- Pusic, A. D. and Kraig, R. P.** (2014). Youth and environmental enrichment generate serum exosomes containing miR-219 that promote CNS myelination. *Glia* **62**, 284–299.
- Qu, H., Liu, R., Chen, J., Zheng, L. and Chen, R.** (2020). Aerobic exercise inhibits CUMS-depressed mice hippocampal inflammatory response via activating hippocampal miR-223/TLR4/MyD88-NF-κB pathway. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 1–17.
- Queen, N. J., Boardman, A. A., Patel, R. S., Siu, J. J., Mo, X. and Cao, L.** (2020). Environmental enrichment improves metabolic and behavioral health in the BTBR mouse model of autism. *Psychoneuroendocrinology* **111**, 104476.
- Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y. P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., Tsien, J. Z. and Hu, Y.** (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12880–4.
- Reilly, S. M. and Saltiel, A. R.** (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 633–643.
- Reilly, S. M., Hung, C. W., Ahmadian, M., Zhao, P., Keinan, O., Gomez, A. V., DeLuca, J. H., Dadpey, B., Lu, D., Zaid, J., et al.** (2020). Catecholamines suppress fatty acid re-esterification and increase oxidation in white adipocytes via STAT3. *Nat. Metab.* **2**, 620–634.
- Remmers, F. and Deleamarre-van de Waal, H. a** (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr. Rev.* **32**, 272–311.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K.** (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140.
- Rosas-Vargas, H., Martínez-Ezquerro, J. D. and Bienvenu, T.** (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch. Med. Res.* **42**, 482–94.
- Rosbergen, I. C. M., Grimley, R. S., Hayward, K. S., Walker, K. C., Rowley, D., Campbell, A. M., McGufficke, S., Robertson, S. T., Trinder, J., Janssen, H., et al.** (2017). Embedding an enriched environment in an acute stroke unit increases activity in people with stroke: A controlled before-after pilot study. *Clin. Rehabil.* **31**, 1516–1528.

- Ross, S. A. and Davis, C. D.** (2014). The Emerging Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 305–336.
- Sabio, G. and Davis, R. J.** (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 490–6.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y., Ko, H. J., Barrett, T., Kim, J. K. and Davis, R. J.** (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* **322**, 1539–43.
- 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 Dev.* **24**, 256–64.
- Saito, Y. and Nagasaki, H.** (2008). The Melanin-Concentrating Hormone System and Its Physiological Functions. In *Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides*, pp. 159–179.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R.** (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806.
- Saltiel, A. R. and Olefsky, J. M.** (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 1–4.
- Sangiao-Alvarellos, S., Pena-Bello, L., Manfredi-Lozano, M., Tena-Sempere, M. and Cordido, F.** (2014). Perturbation of hypothalamic microRNA expression patterns in male rats after metabolic distress: impact of obesity and conditions of negative energy balance. *Endocrinology* **155**, 1838–50.
- 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**, 1774–83.
- Schmitz, J., Evers, N., Awazawa, M., Nicholls, H. T., Brönneke, H. S., Dietrich, A., Mauer, J., Blüher, M. and Brüning, J. C.** (2016). Obesogenic memory can confer long-term increases in adipose tissue but not liver inflammation and insulin resistance after weight loss. *Mol. Metab.* **5**, 328–339.
- Schneeberger, M., Altirriba, J., García, A., Esteban, Y., Castaño, C., García-Lavandeira, M., Alvarez, C. V., Gomis, R. and Claret, M.** (2012). Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol. Metab.* **2**, 74–85.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Jr, D. P., Seeley, R. J. and Baskin, D. G.** (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671.
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S. and Spiegelman, B. M.** (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 96–105.
- Shamah-Levy, T. T., Cuevas-Nasu, L., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., Morales-Ruán, M. del C., Hernández-ávila, M. and Rivera-Dommarco, J. Á.** (2018). Overweight and obesity in children and adolescents, 2016 Halfway National Health and Nutrition Survey update. *Salud Publica Mex.* **60**, 244–253.
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. and Rivera-Dommarco, J.** (2020). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México.
- Shaw, L. M.** (2011). The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle* **10**, 1750–1756.
- Shen, J., Li, Y., Qu, C., Xu, L., Sun, H. and Zhang, J.** (2019). The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. *J. Affect. Disord.* **248**, 81–90.
- Silva, B. A., Leal, M. C., Farías, M. I., Erhardt, B., Galeano, P., Pitossi, F. J. and Ferrari, C. C.** (2020). Environmental enrichment improves cognitive symptoms and pathological features in a focal model of cortical damage of multiple sclerosis. *Brain Res.* **1727**, 146520.
- Simpson, J. and Kelly, J. P.** (2012). The effects of isolated and enriched housing conditions on baseline and drug-induced behavioural responses in the male rat. *Behav. Brain Res.* **234**, 175–83.
- Song, Y., Gan, Y., Wang, Q., Meng, Z., Li, G., Shen, Y., Wu, Y., Li, P., Yao, M., Gu, J., et al.** (2017). Enriching the Housing Environment for Mice Enhances Their NK Cell Antitumor Immunity via Sympathetic Nerve-Dependent Regulation of NKG2D and CCR5. *Cancer Res.* **77**, 1611–1622.
- Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H. and Pfeiffer, A. F. H.** (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: Results of

- the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Diabetes* **52**, 812–817.
- Spyridaki, E. C., Avgoustinaki, P. D. and Margioris, A. N.** (2016). Obesity, inflammation and cognition. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **9**, 169–175.
- Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R. S., Egan, J. M. and Mattson, M. P.** (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* **18**, 1085–1088.
- Stranahan, A. M., Hao, S., Dey, A., Yu, X. and Baban, B.** (2016). Blood-brain barrier breakdown promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 2108–2121.
- 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. *Diabetes* **56**, 2910–8.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. and Baltimore, D.** (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12481–6.
- Tai, M. M.** (1994). A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* **17**, 152–4.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R.** (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 85–96.
- Tapia-González, S., García-Segura, L. M., Tena-Sempere, M., Frago, L. M., Castellano, J. M., Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente, J. and Chowen, J. A.** (2011). Activation of Microglia in Specific Hypothalamic Nuclei and the Cerebellum of Adult Rats Exposed to Neonatal Overnutrition. *J. Neuroendocrinol.* **23**, 365–370.
- Tapocik, J. D., Barbier, E., Flanigan, M., Solomon, M., Pincus, A., Pilling, A., Sun, H., Schank, J. R., King, C. and Heilig, M.** (2014). microRNA-206 in rat medial prefrontal cortex regulates BDNF expression and alcohol drinking. *J. Neurosci.* **34**, 4581–8.
- Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A. and Conesa, A.** (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* **21**, 2213–23.
- Thaler, J. P. and Schwartz, M. W.** (2010). Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* **151**, 4109–15.
- Tonelli, J., Kishore, P., Lee, D. E. and Hawkins, M.** (2005). The regulation of glucose effectiveness: How glucose modulates its own production. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **8**, 450–456.
- Tsai, P.-P., Pachowsky, U., Stelzer, H. D. and Hackbarth, H.** (2002). Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab. Anim.* **36**, 411–9.
- 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. *J. Neurosci.* **27**, 14265–74.
- Valenzuela, R., Hernandez-Rodas, M. C., Espinosa, A., Rincón, M. A., Romero, N., Barrera, C., Marambio, M., Vivero, J. and Valenzuela, A.** (2016). Extra virgin olive oil reduces liver oxidative stress and tissue depletion of long-chain polyunsaturated fatty acids produced by a high saturated fat diet in mice. *Grasas y Aceites* **67**, e129.
- Vallès, A., Martens, G. J. M., De Weerd, P., Poelmans, G. and Aschrafi, A.** (2014). MicroRNA-137 regulates a glucocorticoid receptor-dependent signalling network: Implications for the etiology of schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* **39**, 312–320.
- Van Dyken, P. and Lacoste, B.** (2018). Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Front. Neurosci.* **12**, 1–19.
- van Praag, H., Kempermann, G. and Gage, F. H.** (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **2**, 266–70.
- 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. *Nat. Med.* **17**, 179–88.
- Vannan, A., Powell, G. L., Dell’Orco, M., Wilson, M. A., Perrone-Bizzozero, N. I. and Neisewander, J. L.** (2021). microRNA regulation related to the protective effects of environmental enrichment against

- cocaine-seeking behavior. *Drug Alcohol Depend.* **221**, 108585.
- Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Mihailović, M., Uskoković, A. and Arambašić Jovanović, J.** (2015). The Importance of the CXCL12/CXCR4 Axis in Therapeutic Approaches to Diabetes Mellitus Attenuation. *Front. Immunol.* **6**, 403.
- Vinnikov, I. a, Hajdukiewicz, K., Reymann, J., Beneke, J., Czajkowski, R., Roth, L. C., Novak, M., Roller, A., Dörner, N., Starkuviene, V., et al.** (2014). Hypothalamic miR-103 Protects from Hyperphagic Obesity in Mice. *J. Neurosci.* **34**, 10659–74.
- Vive, S., Af Geijerstam, J. L., Kuhn, H. G. and Bunketorp-Käll, L.** (2020). Enriched, Task-Specific Therapy in the Chronic Phase after Stroke: An Exploratory Study. *J. Neurol. Phys. Ther.* **44**, 144–155.
- Wang, X., Bao, W., Liu, J., Ouyang, Y. Y., Wang, D., Rong, S., Xiao, X., Shan, Z. L., Zhang, Y., Yao, P., et al.** (2013). Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* **36**, 166–175.
- Wang, J., Vasaiakar, S., Shi, Z., Greer, M. and Zhang, B.** (2017). WebGestalt 2017: A more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* **45**, W130–W137.
- Waniek, A., Hartlage-Rübsamen, M., Höfling, C., Kehlen, A., Schilling, S., Demuth, H. U. and Roßner, S.** (2015). Identification of thyrotropin-releasing hormone as hippocampal glutaminyl cyclase substrate in neurons and reactive astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 146–155.
- Wasinski, F., Bacurau, R. F. P., Moraes, M. R., Haro, A. S., Moraes-Vieira, P. M. M., Estrela, G. R., Paredes-Gamero, E. J., Barros, C. C., Almeida, S. S., Câmara, N. O. S., et al.** (2013). Exercise and caloric restriction alter the immune system of mice submitted to a high-fat diet. *Mediators Inflamm.* **2013**,.
- Wei, Z., Meng, X., El Fatimy, R., Sun, B., Mai, D., Zhang, J., Arora, R., Zeng, A., Xu, P., Qu, S., et al.** (2020). Environmental enrichment prevents A β oligomer-induced synaptic dysfunction through mirna-132 and hdac3 signaling pathways. *Neurobiol. Dis.* **134**, 104617.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W.** (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–808.
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W.** (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* **116**, 115–24.
- Wienholds, E. and Plasterk, R. H. A.** (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* **579**, 5911–5922.
- 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. Behav. Immun.* **26**, 500–10.
- Wong, N. and Wang, X.** (2015). miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D146–D152.
- Woo, C. C. and Leon, M.** (2013). Environmental enrichment as an effective treatment for autism: A randomized controlled trial. *Behav. Neurosci.* **127**, 487–497.
- Woo, C. C., Donnelly, J. H., Steinberg-Epstein, R. and Leon, M.** (2015). Environmental enrichment as a therapy for autism: A clinical trial replication and extension. *Behav. Neurosci.* **129**, 412–422.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., et al.** (2012a). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376.
- Wu, L., Li, H., Jia, C. Y., Cheng, W., Yu, M., Peng, M., Zhu, Y., Zhao, Q., Dong, Y. W., Shao, K., et al.** (2012b). MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS Lett.* **586**, 1038–43.
- Wu, H., Zhang, T., Pan, F., Steer, C. J., Li, Z., Chen, X. and Song, G.** (2017). MicroRNA-206 prevents hepatosteatosis and hyperglycemia by facilitating insulin signaling and impairing lipogenesis. *J. Hepatol.* **66**, 816–824.
- Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X. and Li, T.** (2009). miRecords: An integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **37**, 105–110.
- Xiao, F., Yu, J., Liu, B., Guo, Y., Li, K., Deng, J., Zhang, J., Wang, C., Chen, S., Du, Y., et al.** (2014). A

- novel function of MicroRNA 130a-3p in hepatic insulin sensitivity and liver steatosis. *Diabetes* **63**, 2631–2642.
- Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Slater, A. M., Liu, X., Judd, R. T., Lin, E.-J. D., Widstrom, K. J., Scoville, S. D., Yu, J., et al.** (2016). Environmental and Genetic Activation of Hypothalamic BDNF Modulates T-cell Immunity to Exert an Anticancer Phenotype. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 488–497.
- Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Mansour, A. G., Liu, X., Judd, R. T., Widstrom, K. J., Queen, N. J., Wilkins, R. K., Siu, J. J., et al.** (2019). Enriched environment regulates thymocyte development and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Brain. Behav. Immun.* **75**, 137–148.
- Xie, Y., Chu, A., Feng, Y., Chen, L., Shao, Y., Luo, Q., Deng, X., Wu, M., Shi, X. and Chen, Y.** (2018). MicroRNA-146a: A comprehensive indicator of inflammation and oxidative stress status induced in the brain of chronic T2DM rats. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–11.
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H. and Reichardt, L. F.** (2003a). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 736–42.
- 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.** (2003b). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–30.
- 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.
- Xue, W., Fan, Z., Li, L., Lu, J., Zhai, Y. and Zhao, J.** (2019). The chemokine system and its role in obesity. *J. Cell. Physiol.* **234**, 3336–3346.
- Yang, W. M., Min, K. H. and Lee, W.** (2016). Induction of mir-96 by dietary saturated fatty acids exacerbates hepatic insulin resistance through the suppression of INSR and IRS-1. *PLoS One* **11**, 1–17.
- Yao, L., Heuser-Baker, J., Herlea-Pana, O., Zhang, N., Szveda, L. I., Griffin, T. M. and Barlic-Dicen, J.** (2014). Deficiency in adipocyte chemokine receptor CXCR4 exacerbates obesity and compromises thermoregulatory responses of brown adipose tissue in a mouse model of diet-induced obesity. *FASEB J.* **28**, 4534–50.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L.** (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134.
- Yehuda-Shnaidman, E., Buehrer, B., Pi, J., Kumar, N. and Collins, S.** (2010). Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis. *Diabetes* **59**, 2474–2483.
- 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* **293**, 1673–7.
- Zarif, H., Nicolas, S., Guyot, M., Hosseiny, S., Lazzari, A., Canali, M. M., Cazareth, J., Brau, F., Golzné, V., Dourneau, E., et al.** (2018). CD8+ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. *Brain. Behav. Immun.* **69**, 235–254.
- 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. *Int. J. Obes. (Lond)*. **31**, 1420–8.
- Zhang, B., Kirov, S. and Snoddy, J.** (2005). WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* **33**, 741–748.
- 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, H., Shang, Q., Pan, Z., Bai, Y., Li, Z., Zhang, H., Zhang, Q., Guo, C., Zhang, L. and Wang, Q.** (2018). Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes* **67**, 235–247.
- Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segrè, A. V., Shinoda, G., Shah, S. P., Einhorn, W. S., Takeuchi, A., Engreitz, J. M., Hagan, J. P., Kharas, M. G., et al.** (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* **147**, 81–94.
- Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P. S., Shi, L., Xu, H., Li, H., Wang, G., Evans, A. R., Safe, S., et al.** (2012). A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose

tissue inflammation. *Circulation* **125**, 2892–903.

Zocher, S., Overall, R. W., Lesche, M., Dahl, A. and Kempermann, G. (2021). Environmental enrichment preserves a young DNA methylation landscape in the aged mouse hippocampus. *Nat. Commun.* **12**,.

Zorrilla, E. P., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., Brennan, M., Fernandez, R., Bartfai, T. and Conti, B. (2007). Interleukin-18 controls energy homeostasis by suppressing appetite and feed efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11097–11102.

APÉNDICE I: FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1 – Condiciones de Ambiente Enriquecido

A) Foto representativa de jaulas de ambiente normal. B-H) Fotos representativas de diferentes arreglos de las cajas de ambiente enriquecido utilizados durante el estudio.



Figura suplementaria 2 – Expresión diferencial de microRNAs en el hipotálamo

Mapa de calor representando la expresión de los 41 microRNAs que se expresaron diferencialmente entre nuestras condiciones experimentales (determinado por dos programas) por muestra.

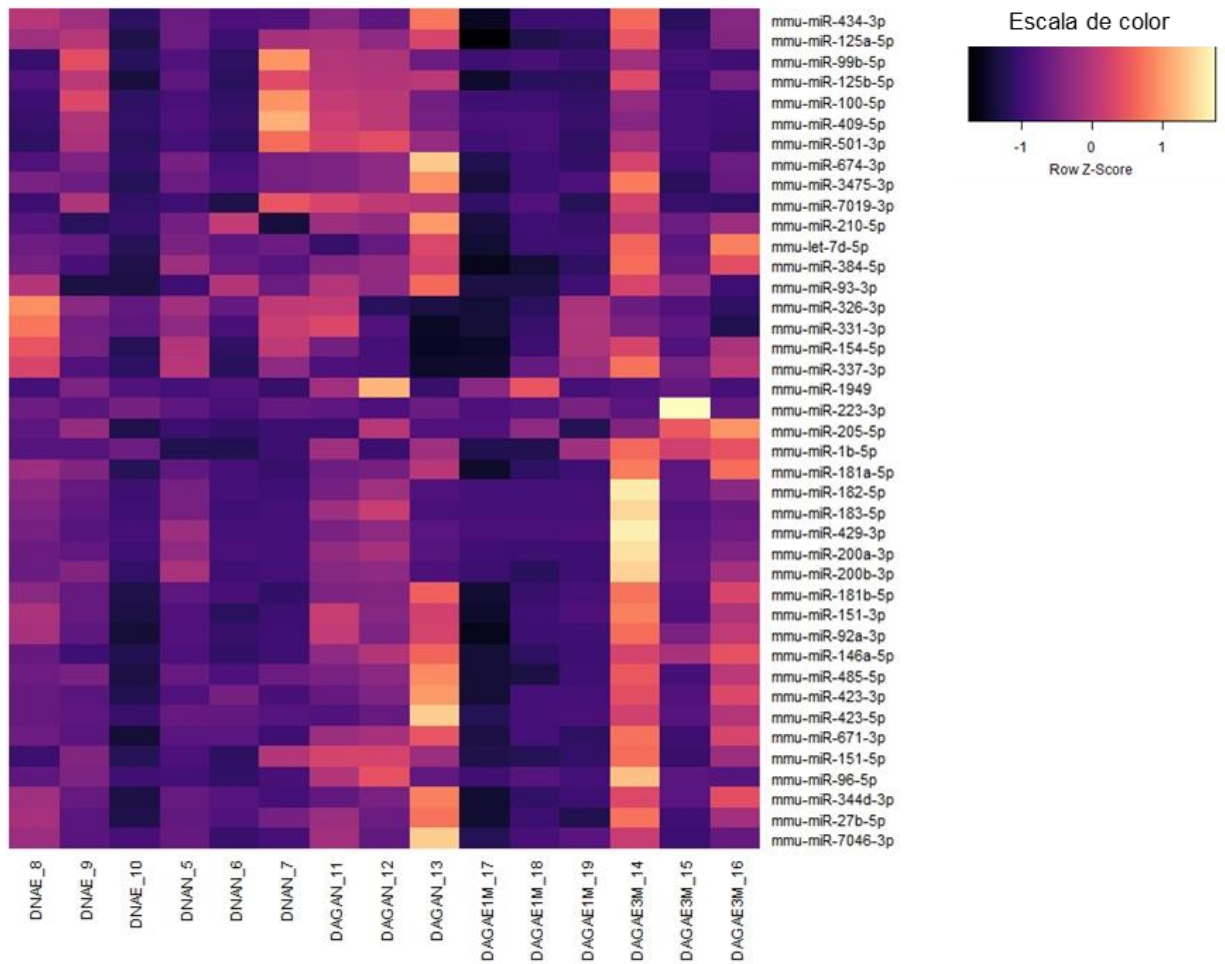


Figura suplementaria 3 – Sitios de unión de microRNAs en la 3' UTR de *Bdnf*

Sitios de unión de microRNAs encontrados en nuestros análisis identificados por Targetscan y PITA para la 3'UTR de *Bdnf*.

```
>BDNF 3' UTR
TCGGGCCCTTACTATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTTCATAAGGATAGACACTTCCTGTGTA
TGTACACTGACCATTAAAAGGGGAAGATAGTGGATTTATGTTGTATAGATTATATTTGAGACAAAATTATC
TATTTGTATATATACATAACAGGGTAAATTATTCAGTTAAGAAAAATAATTTTATGAACGCATGTATA
AATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTCTACAATCTATTTTATTTGGACATATCCATGACCTGAAAGGAAACA
GTCATTTGCGCACAACTTTAAAAGTCTGCATTACATTCCCTCGATAATGTTGTGGTTTGTGCGCTTGCCA
AGAATTGAAAACAAAAAGTTTAAAAAAAATAATAATAAATTGCATGCTGCTTTAATTGTGAATTGATAAT
AAACTGTCCCTCTTTTCAGAAAAAGATTAAAAAACAAAAAACAAAAAACAAAAAACAAAAAACAAAAAC
AAAAATTGGAACCAAAACATTCCGTTTACATTTTAGACACTAAGTATCTTCGTTCTTGTAGTACTCTGT
TTTACTGCTTTCGACTTCTGATAGCGTTGGAATTAACAATGTCAAGGTGCTGTGTCATTGCTTTACT
GGCGTAAGGACGGGGAAATGGGAGGGGTAGATTTCTGTTTGTGTTTGTGTTTTATTTGTTTGTGTTGTTG
TTTTGTTTTTTAGTTCCACCCGGAGTAGGGATGGAGAAAATTTCTTCACTATCCATTCTGGTTGATAAAG
CGTTACATTTGTATGTTGTAAGATGTTTGCAAAATCCAATCAGATGACTGGAAAACAAATAAAAAATTA
GGCAACTGAATAAAATGCTCACACTCCACTGCCCATGATGTATCTCCCTGGTCCCTCAGCTCACTCTT
CTGGCATGGGTGAGGAAAAATGCTTTTATTTGAAAGACCAGCATTGTTCAAAGCATACTCTTTCCCTC
CTCCTCCCATTTTGGTCCCTCTTTTTGTTTTGTTTTAAGAAAGAAAATTAAGTTGCGCGCTTTAAAAT
ATTTTACTACTGCTACAAAACAGATGAACAATGTGTGTCATTTTATGACACTCATGAAAAACAGTGATTTT
TTTTTACCCTAAAGAAAAACAAATAAAAAATAACCCAAAATATTTCTTTTTTAAAAGGCATAAATATTGGG
TAAATTGTAATATGGCCTAAACAGTGTTCAGAGATAAAAGTTATTTGTATACACCAGATACTTAGATAAGA
GCAGGGATCCACTGCCATTGAAATAGGACTGAATGGCCCTGCGGAGGCTAAGTGGAGCTGACATACTA
TTTCTGGCAGTGCAGGAGGAATTTCTGAGTGGCCATCCTAAGGTCTAGGATGGAGGTGGGGAATGGTAC
TTGAGACATTCCTAAAGGAAGGCTCGGAAGCACCTTCAGAGCAGGCTCTGGAATGATGTGTCAAGTTGC
TTAGGCCTTCTGCTTTAAGTGCCTACATTACCTAACAGTGTCAAGAGGTTCTCGATTGGAGAACCACAC
TCAAATCCATTTATAGCCTCCATCCCATTTCTAAATAATTTGTGTATAAAGTTGGATTAACCTGGAGCAAC
TTTGGATCCAAATATGGCACAGCAATAATGATATTAATGCAGCATGATGGAAATGTTTGTGTGAAGAG
AATTGATTTGCTTTGAGCTTAGACTTCAGGAAGCCTAGGTTTTTATTTTTTTATTTTTGAGACATTTTG
GTAAAAGGAAAAAGAAAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAA
TGAGCAATGCTGAAAGGGCTAGAAAAACAAGACATAGCAAGGTGCTTTCACTGTGAAAGAGACAAGAAC
ACAGGAGGAAATATTGCTTCAGTGAAGAGCACAGACGGCTCCTGCCAATTTATTACAAGAGTCCCGTCTG
TACTTTACCCTTTGGGGTTAGAAGTCAAGTTGGAAGCCTGAATGAATGGACCCAATGAGAAGTGTGTTA
AGCCATTTCCCTAGTCAAGTTTTTTTCAAGCGTGAATGTGTTAGTGGTACTCTCCTGGGTTCTGAGC
ATCAGAAAAAAGAAAAAAGAGGCAACAATCGCTTCATCTTAGGAGTGGAAAGGAAACAGAAGTGGAC
GTCCGCTGTGACTCAGGAGTGAAGATACCATCAGCAAATAGTTCTTTTTTGTTCATTCTGTTCCCTTCG
AGTTAGCCTGTCTTTTGGAAATACCCTGAATATGCTGTTTTTGAAGACTTCATGTAGCATAGATTGTTT
TGTGCCGTTTACCAAAATTAACCTTTGTGTCATCGTTTTTTAACCTATTTCAGGAATGCTTGGAAATATCTGCTC
TATGTTAACTTTTTGTCAGCTTCATTCTGAGAGACATTAGTCAAAACAAACAAAGGATCCCCATCACAATC
TTACAGTACTGCAAGGGCCAGGCTGTGTTAATCGGCTTCACAGGAGACATCAGCAATTTGTGTGGTCACTGG
CTGGCTCTCTTACCCACTAAGATACATCATAGCTACATGTTGGTGGTTTATGTTGACCTGAGATTTATTT
GTTAAAATCTCTTCTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTTCTGTT
AAGTCTTGTGCTGTTGCTCTTGTGTTGGCAGAAATGTTTTATGCATGGCAGCAGGCTGTTGCTTTTTTATAG
TGATTCCCATTGAAACTGTAAGTAAATGTCTGTGGCCTTGTCTCTCTATGGTAAAGATATTATTCACCA
TGTAACAAGAAAAAATATTTATTGTATTTTAGTATATTTATATAAATATGTTATTGAAAAAATTGGCA
TTAAAACCTAACACATCAGAAGCCTATTGTAAATACAGGTTCTATTTAAGTGTACCAATTAACATATAA
TATATGTTTTAAATATAGAATTTTTAATGTTTTTAAATATATTTTCAAAGT
```

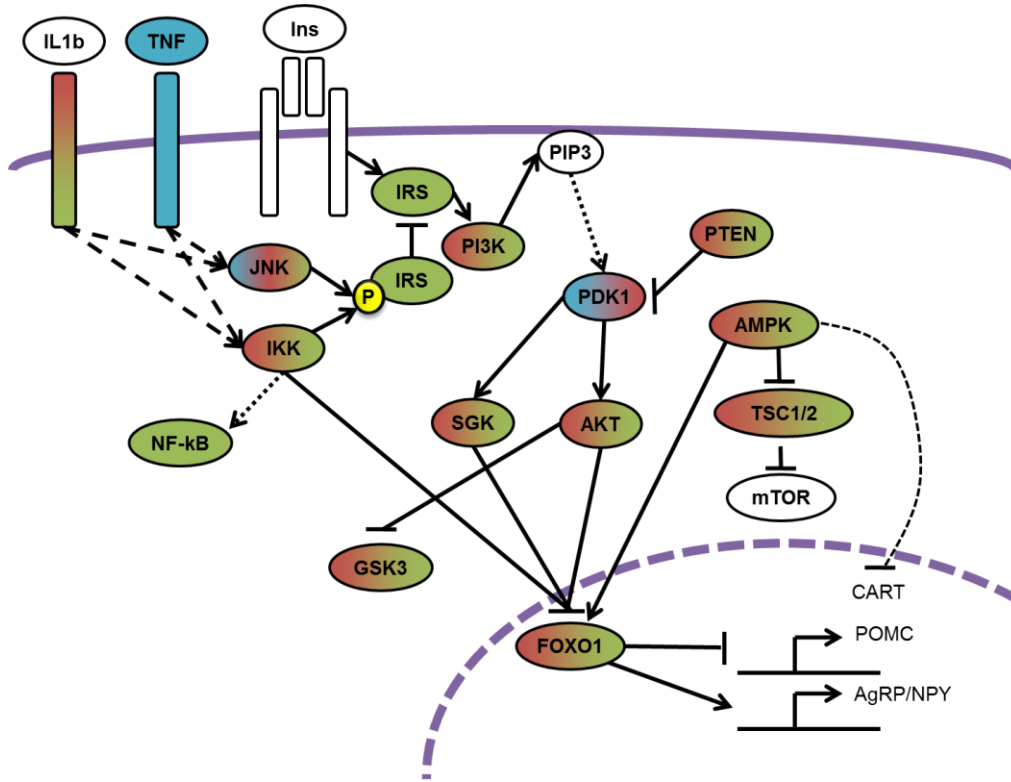
Region codificante
3' UTR
miR-206-3p
miR-182-5p

miR-151-5p
miR-337-3p
miR-181-5p
miR-200-3p

miR-423-5p
miR-125-5p

Figura suplementaria 4 – Blancos de microRNAs en la vía de insulina

Blancos predichos para los microRNAs de los 3 clústeres identificados en la vía de señalización de insulina. Blancos para los microRNAs del clúster 1 están mostrados en azul, clúster 2 en rojo y clúster 3 en verde.



APÉNDICE II: TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1 - El ambiente enriquecido reduce los niveles de citocinas y quimiocinas en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

PROTEINA	DN AN	DAG AN	DAG AE 1M	DAG AE 3M
LEPTINA	1	4.8	0.8	1.9
CXCL1	1	3.5	1.6	1.5
IL-12 P70	1	3.3	0.3	0.9
CCL11	1	2.9	0.6	1.2
TNFR1	1	2.9	0.6	0.9
G-CSF	1	2.7	0.6	0.6
IL-9	1	2.6	0.7	1.2
CCL24	1	2.5	1.1	1.6
CCL9	1	2.5	0.1	0.5
CD30L	1	2.3	0.6	1.1
CX3CL1	1	2.3	0.1	0.7
IL-2	1	2.3	0.6	0.9
M-CSF	1	2.3	0.4	0.7
TNFR2	1	2.3	0.5	0.7
FASL	1	2.2	0.8	0.9
CCL2	1	2.1	0.5	0.7
TNF	1	2.1	1	1.1
CCL3	1	2	2.6	0.5
CXCL11	1	1.7	0.7	0.5
CCL1	1	1.6	0.8	0.8
IL-6	1	1.4	0.4	0.5
XCL1	1	1.4	0.5	0.9
IFN γ	1	1.3	0.7	1
IL-1A	1	1.3	0.5	0.6
IL-12 (P40/P70)	1	1.1	1.3	0.5
IL-4	1	1	0.7	0.6
CXCL13	1	0.5	0.8	1.2
CXCL12	1	0.5	0.8	1.2
GM-CSF	1	0.4	0.5	0.8
CCL5	1	0.4	0.5	0.6
TIMP-1	1	0.4	0	0.1
IL-3	1	0.3	0.8	0.9
IL-13	1	0.3	0.4	0.5
IL-17A	1	0.3	0.8	1.2
CXCL5	1	0.3	0.5	0.8
CCL25	1	0.3	0.1	0.1
TIMP-2	1	0.3	0.6	0.7
IL-1B	1	0.2	0.1	0.1
IL-10	1	0.2	0	0.1
CXCL9	1	0.2	0	0.1

Datos crudos de la figura 9. Se determinaron los niveles de marcadores inflamatorios en el tejido adiposo epididimal de los ratones en los grupos experimentales utilizando un arreglo de anticuerpos, después de determinar los valores por densitometría los datos fueron normalizados contra el grupo DN AN (n=1 ratón por grupo).

Tabla suplementaria 2 – Alineamiento de las lecturas obtenidas de la secuenciación de RNAs pequeños por muestra

	Filtradas	Sin alinear	Alineadas			Total de lecturas
			microRNAs	piRNAs	Otras regiones	
DNAN_5	337,009	233012	2540947	18529	499159	3,628,656
DNAN_6	17,080	197684	1834856	18551	500514	2,768,685
DNAN_7	238,464	226828	2648257	18915	575212	3,707,676
DNAE_8	445,050	572624	3606309	59440	1534408	6,217,831
DNAE_9	252,897	286099	3071866	26140	694224	4,331,226
DNAE_10	227,350	236059	1734108	27791	845704	3,071,012
DAGAN_11	386,789	479648	3012597	40672	1038660	4,958,366
DAGAN_12	515,258	386200	2790252	40519	878636	4,610,865
DAGAN_13	422,961	454082	2955316	43777	1022104	4,898,240
DAGAE3M_14	773,596	444328	4629483	42921	983346	6,873,674
DAGAE3M_15	357,870	352636	2317696	119133	1969163	5,116,498
DAGAE3M_16	533,849	471608	3585317	42354	1123038	5,756,166
DAGAE1M_17	165,585	151393	1281742	13600	375303	1,987,623
DAGAE1M_18	271,442	369130	2078514	43432	1071497	3,834,015
DAGAE1M_19	437,415	280604	2530053	22636	646508	3,917,216

Número de lecturas por muestra que fueron filtradas, sin alinear, que alinearon contra el genoma de ratón en regiones correspondientes a RNAs pequeños (microRNAs y piRNAs) o a otras regiones.

Tabla suplementaria 3 – Porcentaje de lecturas obtenidas de la secuenciación de RNAs pequeños

	Filtradas	Sin alinear	Alineadas			Total de lecturas
			microRNAs	piRNAs	Otras regiones	
DNAN_5	9.2874	6.4214	70.0245	0.5106	13.7560	100
DNAN_6	7.8405	7.1400	66.2717	0.6700	18.0777	100
DNAN_7	6.4316	6.1178	71.4263	0.5102	15.5141	100
DNAE_8	7.1576	9.2094	57.9995	0.9560	24.6775	100
DNAE_9	5.8389	6.6055	70.9237	0.6035	16.0283	100
DNAE_10	7.4031	7.6867	56.4670	0.9049	27.5383	100
DAGAN_11	7.8007	9.6735	60.7579	0.8203	20.9476	100
DAGAN_12	11.1749	8.3759	60.5147	0.8788	19.0558	100
DAGAN_13	8.6350	9.2703	60.3342	0.8937	20.8668	100
DAGAE3M_14	11.2545	6.4642	67.3509	0.6244	14.3060	100
DAGAE3M_15	6.9944	6.8921	45.2985	2.3284	38.4865	100
DAGAE3M_16	9.2744	8.1931	62.2865	0.7358	19.5102	100
DAGAE1M_17	8.3308	7.6168	64.4862	0.6842	18.8820	100
DAGAE1M_18	7.0798	9.6278	54.2125	1.1328	27.9471	100
DAGAE1M_19	11.1665	7.1634	64.5880	0.5779	16.5043	100

Porcentaje de lecturas por muestra que fueron filtradas, sin alinear, que alinearon contra el genoma de ratón en regiones correspondientes a RNAs pequeños (microRNAs y piRNAs) o a otras regiones.

Tabla suplementaria 4 – microRNAs encontrados en la secuenciación de RNA pequeños

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-127-3p	12007136	432939	1343843	800475.733	29.5616207	15
mmu-miR-181a-5p	2820243	80392	354961	188016.2	6.94345044	15
mmu-miR-26a-5p	1887106	54165	221123	125807.067	4.64606312	15
mmu-miR-30a-5p	1185163	40748	132626	79010.8667	2.91787642	15
mmu-miR-9-5p	1079320	29280	129676	71954.6667	2.6572905	15
mmu-miR-434-3p	1069596	26837	133067	71306.4	2.63334997	15
mmu-let-7f-5p	1035119	26957	143773	69007.9333	2.54846745	15
mmu-miR-22-3p	1020962	29175	125972	68064.1333	2.51361285	15
mmu-miR-143-3p	962702	33100	100009	64180.1333	2.37017648	15
mmu-miR-27b-3p	865921	26692	102127	57728.0667	2.13190124	15
mmu-miR-410-3p	773680	21626	86376	51578.6667	1.9048035	15
mmu-miR-541-5p	617442	20380	71848	41162.8	1.52014487	15
mmu-miR-191-5p	494101	16401	51828	32940.0667	1.2164788	15
mmu-let-7c-5p	487148	14853	59052	32476.5333	1.19936048	15
mmu-miR-125a-5p	472569	10269	50288	31504.6	1.16346692	15
mmu-miR-125b-5p	451313	9711	51991	30087.5333	1.11113455	15
mmu-miR-92b-3p	450322	10426	58715	30021.4667	1.10869471	15
mmu-miR-181c-5p	426344	13717	45460	28422.9333	1.04966077	15
mmu-miR-99b-5p	406808	6209	82007	27120.5333	1.00156305	15
mmu-miR-126b-3p	395196	14960	41030	26346.4	0.97297426	15
mmu-miR-126a-5p	395170	14959	41027	26344.6667	0.97291025	15
mmu-miR-204-5p	392902	12242	40212	26193.4667	0.96732642	15
mmu-let-7i-5p	374315	9893	49637	24954.3333	0.92156515	15
mmu-let-7a-5p	366218	10389	45104	24414.5333	0.9016303	15
mmu-miR-101a-3p	362447	10846	40471	24163.1333	0.89234608	15
mmu-miR-29a-3p	359142	10709	37318	23942.8	0.88420915	15
mmu-miR-3071-5p	324431	10728	34945	21628.7333	0.79875052	15
mmu-miR-300-3p	271891	8422	33472	18126.0667	0.66939682	15
mmu-miR-381-3p	258616	7265	30067	17241.0667	0.63671371	15
mmu-let-7g-5p	257709	7464	31960	17180.6	0.63448067	15
mmu-miR-30d-5p	239902	7802	27949	15993.4667	0.59063976	15
mmu-miR-411-5p	236466	7019	28287	15764.4	0.58218031	15
mmu-miR-181b-5p	223004	5969	28849	14866.9333	0.54903681	15
mmu-miR-100-5p	207270	2851	43404	13818	0.51029964	15
mmu-miR-128-3p	187937	4387	23638	12529.1333	0.46270171	15
mmu-miR-103-3p	174601	4792	18597	11640.0667	0.42986842	15
mmu-miR-3107-3p	174322	6015	18392	11621.4667	0.42918152	15
mmu-miR-486-5p	174322	6015	18392	11621.4667	0.42918152	15
mmu-miR-3107-5p	172053	6027	18146	11470.2	0.42359523	15
mmu-miR-26b-5p	163135	5476	17153	10875.6667	0.40163907	15
mmu-miR-148a-3p	154859	5059	17575	10323.9333	0.38126353	15
mmu-miR-298-5p	140536	3761	18808	9369.06667	0.34600024	15
mmu-miR-138-5p	139985	4046	15857	9332.33333	0.34464367	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-16-5p	132187	4405	14450	8812.46667	0.32544496	15
mmu-miR-34c-5p	132055	4339	14875	8803.66667	0.32511998	15
mmu-miR-3071-3p	124613	3779	14035	8307.53333	0.30679774	15
mmu-miR-124-3p	123350	4566	13282	8223.33333	0.30368823	15
mmu-miR-153-3p	121258	3864	14465	8083.86667	0.29853772	15
mmu-miR-136-5p	121156	3684	13627	8077.06667	0.2982866	15
mmu-miR-3065-5p	116657	3956	15595	7777.13333	0.28721004	15
mmu-miR-186-5p	115231	3720	12628	7682.06667	0.28369922	15
mmu-miR-338-3p	113646	3862	15276	7576.4	0.27979694	15
mmu-miR-434-5p	112277	3609	12756	7485.13333	0.27642646	15
mmu-let-7e-5p	112180	2978	13301	7478.66667	0.27618764	15
mmu-miR-151-3p	108864	3008	14117	7257.6	0.26802364	15
mmu-miR-340-5p	103503	3025	12687	6900.2	0.25482483	15
mmu-miR-30c-5p	99521	2817	9959	6634.73333	0.24502113	15
mmu-miR-218-5p	96977	3183	10817	6465.13333	0.23875779	15
mmu-miR-744-5p	96573	2470	11936	6438.2	0.23776314	15
mmu-miR-99a-5p	85514	2670	12509	5700.93333	0.21053584	15
mmu-miR-21a-5p	85264	2749	9119	5684.26667	0.20992034	15
mmu-miR-192-5p	84887	2836	9295	5659.13333	0.20899216	15
mmu-miR-301a-3p	75911	2340	8380	5060.73333	0.18689321	15
mmu-miR-29c-3p	75421	2298	7536	5028.06667	0.18568683	15
mmu-let-7d-5p	74465	1825	10114	4964.33333	0.18333315	15
mmu-miR-92a-3p	74093	1824	8901	4939.53333	0.18241729	15
mmu-miR-328-3p	73023	2396	7995	4868.2	0.17978294	15
mmu-miR-132-3p	72161	2124	8263	4810.73333	0.17766069	15
mmu-let-7b-5p	66555	1983	7194	4437	0.1638587	15
mmu-miR-98-5p	66517	1775	7451	4434.46667	0.16376514	15
mmu-miR-181d-5p	64062	1977	7516	4270.8	0.15772092	15
mmu-miR-30e-5p	61072	2022	7017	4071.46667	0.15035953	15
mmu-miR-330-5p	60573	1582	6743	4038.2	0.14913099	15
mmu-miR-149-5p	58951	1566	6304	3930.06667	0.14513762	15
mmu-miR-873a-5p	56692	1864	6438	3779.46667	0.13957595	15
mmu-miR-3074-5p	48930	1917	4945	3262	0.12046587	15
mmu-miR-24-3p	48763	1906	4926	3250.86667	0.12005472	15
mmu-miR-101b-3p	47740	1456	5346	3182.66667	0.11753609	15
mmu-miR-488-3p	47698	1652	6260	3179.86667	0.11743268	15
mmu-miR-129-2-3p	46369	1246	4775	3091.26667	0.11416068	15
mmu-miR-146b-5p	46293	1431	5310	3086.2	0.11397357	15
mmu-miR-879-5p	45835	1536	5482	3055.66667	0.11284597	15
mmu-miR-140-3p	44739	1344	5020	2982.6	0.11014761	15
mmu-miR-135a-5p	43070	1532	4652	2871.33333	0.10603853	15
mmu-miR-125b-2-3p	42380	1501	4912	2825.33333	0.10433974	15
mmu-miR-384-5p	42139	957	5238	2809.26667	0.1037464	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-30b-5p	41485	1169	4275	2765.66667	0.10213625	15
mmu-miR-380-3p	40176	1256	4639	2678.4	0.09891349	15
mmu-miR-335-3p	38702	1392	4534	2580.13333	0.09528449	15
mmu-miR-126b-5p	37932	1211	4164	2528.8	0.09338875	15
mmu-miR-409-3p	37725	1034	4329	2515	0.09287911	15
mmu-miR-598-3p	37201	1418	3920	2480.06667	0.09158902	15
mmu-miR-129-5p	37174	1156	3956	2478.26667	0.09152255	15
mmu-miR-107-3p	37104	1010	3977	2473.6	0.09135021	15
mmu-miR-126a-3p	36279	1164	3998	2418.6	0.08931905	15
mmu-miR-29b-3p	35760	1045	4284	2384	0.08804127	15
mmu-miR-148b-3p	34804	1196	3557	2320.26667	0.0856876	15
mmu-miR-221-3p	33387	975	3575	2225.8	0.08219894	15
mmu-miR-433-3p	32852	983	3454	2190.13333	0.08088177	15
mmu-miR-342-3p	32334	1008	3263	2155.6	0.07960645	15
mmu-miR-182-5p	32262	332	10810	2150.8	0.07942918	15
mmu-miR-369-3p	31934	1042	3415	2128.93333	0.07862165	15
mmu-miR-1843a-5p	31483	867	3714	2098.86667	0.07751128	15
mmu-miR-326-3p	30972	633	4672	2064.8	0.0762532	15
mmu-miR-384-3p	29871	960	3894	1991.4	0.07354253	15
mmu-miR-487b-3p	29798	738	3697	1986.53333	0.0733628	15
mmu-miR-137-3p	29226	912	2984	1948.4	0.07195454	15
mmu-miR-7a-5p	28518	923	4809	1901.2	0.07021144	15
mmu-miR-758-3p	27290	806	2924	1819.33333	0.0671881	15
mmu-miR-27a-3p	26761	788	2724	1784.06667	0.0658857	15
mmu-miR-582-3p	26241	838	2826	1749.4	0.06460546	15
mmu-miR-532-5p	25448	771	2826	1696.53333	0.06265309	15
mmu-miR-130a-3p	25318	720	3256	1687.86667	0.06233303	15
mmu-miR-25-3p	24609	773	2602	1640.6	0.06058746	15
mmu-miR-30e-3p	24325	807	2885	1621.66667	0.05988826	15
mmu-miR-382-5p	24162	740	2799	1610.8	0.05948695	15
mmu-miR-872-5p	24107	773	3068	1607.13333	0.05935154	15
mmu-miR-421-3p	23384	653	2876	1558.93333	0.05757151	15
mmu-miR-369-5p	22829	604	2898	1521.93333	0.0562051	15
mmu-miR-666-5p	22493	668	2561	1499.53333	0.05537786	15
mmu-miR-383-5p	21636	617	2793	1442.4	0.05326793	15
mmu-miR-676-3p	21385	513	2848	1425.66667	0.05264996	15
mmu-miR-23b-3p	20958	701	2223	1397.2	0.05159869	15
mmu-miR-708-3p	20933	603	2292	1395.53333	0.05153714	15
mmu-miR-9-3p	20496	579	2216	1366.4	0.05046124	15
mmu-miR-331-3p	20436	443	2728	1362.4	0.05031352	15
mmu-miR-212-5p	20369	512	3053	1357.93333	0.05014857	15
mmu-miR-376b-3p	19833	664	2138	1322.2	0.04882893	15
mmu-miR-1839-5p	19135	482	2281	1275.66667	0.04711045	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-93-5p	18850	575	1983	1256.66667	0.04640878	15
mmu-miR-668-3p	18737	418	2433	1249.13333	0.04613057	15
mmu-miR-10a-5p	18727	726	2567	1248.46667	0.04610595	15
mmu-miR-344-3p	18184	537	2066	1212.26667	0.04476909	15
mmu-miR-30a-3p	17933	626	1927	1195.53333	0.04415112	15
mmu-miR-150-5p	17510	413	1866	1167.33333	0.0431097	15
mmu-miR-125b-1-3p	17224	463	2416	1148.26667	0.04240556	15
mmu-miR-667-3p	17147	451	1828	1143.13333	0.04221599	15
mmu-let-7d-3p	16508	436	1731	1100.53333	0.04064277	15
mmu-miR-134-5p	16475	501	1776	1098.33333	0.04056152	15
mmu-miR-495-3p	16418	510	2002	1094.53333	0.04042119	15
mmu-miR-378a-3p	16135	487	1763	1075.66667	0.03972444	15
mmu-miR-139-5p	15887	445	1675	1059.13333	0.03911386	15
mmu-miR-666-3p	15328	416	1815	1021.86667	0.0377376	15
mmu-miR-219a-2-3p	15211	405	1869	1014.06667	0.03744955	15
mmu-miR-3059-5p	14787	563	1843	985.8	0.03640566	15
mmu-miR-361-5p	14709	442	1572	980.6	0.03621362	15
mmu-miR-212-3p	13944	391	1747	929.6	0.03433019	15
mmu-miR-7b-5p	13639	398	2206	909.266667	0.03357928	15
mmu-miR-375-3p	13431	508	2301	895.4	0.03306718	15
mmu-miR-1298-5p	13211	447	1522	880.733333	0.03252554	15
mmu-miR-10b-5p	13168	444	1473	877.866667	0.03241967	15
mmu-miR-335-5p	13167	354	1610	877.8	0.03241721	15
mmu-miR-451a	12992	518	1374	866.133333	0.03198636	15
mmu-miR-872-3p	12488	405	1312	832.533333	0.03074551	15
mmu-miR-1843b-5p	12377	339	1447	825.133333	0.03047223	15
mmu-miR-409-5p	12292	35	3477	819.466667	0.03026296	15
mmu-miR-652-3p	12224	386	1216	814.933333	0.03009554	15
mmu-miR-23a-3p	12154	407	1212	810.266667	0.0299232	15
mmu-miR-496a-3p	11847	376	1435	789.8	0.02916737	15
mmu-miR-376b-5p	11655	426	1129	777	0.02869466	15
mmu-miR-320-3p	11287	338	1380	752.466667	0.02778864	15
mmu-miR-146a-5p	11175	299	1399	745	0.0275129	15
mmu-miR-425-5p	10799	296	1203	719.933333	0.02658718	15
mmu-miR-3547-3p	10587	291	1182	705.8	0.02606524	15
mmu-miR-370-3p	10551	256	1124	703.4	0.02597661	15
mmu-miR-329-5p	10508	307	1122	700.533333	0.02587074	15
mmu-miR-136-3p	10217	286	1174	681.133333	0.0251543	15
mmu-miR-664-3p	9584	305	1161	638.933333	0.02359585	15
mmu-miR-344d-3p	9288	222	1280	619.2	0.0228671	15
mmu-miR-431-5p	9018	235	1072	601.2	0.02220235	15
mmu-miR-344b-3p	8872	232	974	591.466667	0.0218429	15
mmu-miR-501-3p	8821	81	1634	588.066667	0.02171734	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-132-5p	8750	251	1105	583.333333	0.02154254	15
mmu-miR-379-5p	8687	314	1155	579.133333	0.02138743	15
mmu-miR-330-3p	8677	275	978	578.466667	0.02136281	15
mmu-miR-411-3p	8329	271	838	555.266667	0.02050603	15
mmu-miR-708-5p	7985	274	900	532.333333	0.0196591	15
mmu-miR-484	7941	237	906	529.4	0.01955078	15
mmu-miR-770-3p	7821	220	882	521.4	0.01925534	15
mmu-miR-490-3p	7745	241	848	516.333333	0.01906822	15
mmu-miR-592-5p	7741	282	920	516.066667	0.01905838	15
mmu-miR-15a-5p	7601	241	895	506.733333	0.01871369	15
mmu-miR-154-5p	7515	286	741	501	0.01850196	15
mmu-miR-1298-3p	7513	193	842	500.866667	0.01849704	15
mmu-miR-3099-3p	7294	198	988	486.266667	0.01795786	15
mmu-miR-582-5p	7229	226	906	481.933333	0.01779783	15
mmu-miR-770-5p	7124	204	657	474.933333	0.01753932	15
mmu-miR-540-3p	7097	175	1005	473.133333	0.01747284	15
mmu-miR-376a-5p	7093	242	770	472.866667	0.017463	15
mmu-miR-351-5p	6837	196	842	455.8	0.01683272	15
mmu-miR-6944-3p	6566	172	842	437.733333	0.01616552	15
mmu-miR-1224-5p	6553	214	681	436.866667	0.01613351	15
mmu-miR-324-5p	6541	158	930	436.066667	0.01610397	15
mmu-miR-185-5p	6525	197	692	435	0.01606458	15
mmu-miR-485-5p	6496	149	961	433.066667	0.01599318	15
mmu-miR-673-5p	6387	198	676	425.8	0.01572482	15
mmu-miR-376a-3p	6090	189	645	406	0.01499361	15
mmu-miR-222-3p	6078	177	670	405.2	0.01496406	15
mmu-miR-195a-5p	5868	240	557	391.2	0.01444704	15
mmu-miR-34a-5p	5859	185	556	390.6	0.01442488	15
mmu-miR-34b-5p	5842	195	762	389.466667	0.01438303	15
mmu-miR-129b-5p	5836	140	558	389.066667	0.01436826	15
mmu-miR-485-3p	5685	161	577	379	0.01399649	15
mmu-miR-145a-5p	5610	179	659	374	0.01381184	15
mmu-miR-672-5p	5537	169	641	369.133333	0.01363212	15
mmu-miR-423-3p	5384	124	829	358.933333	0.01325543	15
mmu-miR-3068-3p	5365	166	614	357.666667	0.01320865	15
mmu-miR-874-3p	5355	195	559	357	0.01318403	15
mmu-miR-338-5p	5297	160	634	353.133333	0.01304124	15
mmu-miR-423-5p	5183	97	1102	345.533333	0.01276057	15
mmu-miR-543-3p	5129	135	549	341.933333	0.01262762	15
mmu-miR-323-3p	5127	154	575	341.8	0.0126227	15
mmu-miR-3544-3p	4934	151	543	328.933333	0.01214753	15
mmu-miR-873a-3p	4831	153	544	322.066667	0.01189394	15
mmu-miR-673-3p	4817	130	589	321.133333	0.01185947	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-337-5p	4803	146	528	320.2	0.01182501	15
mmu-miR-193b-3p	4794	130	687	319.6	0.01180285	15
mmu-let-7b-3p	4763	159	500	317.533333	0.01172653	15
mmu-miR-361-3p	4747	120	505	316.466667	0.01168713	15
mmu-miR-203-3p	4657	147	522	310.466667	0.01146555	15
mmu-miR-194-5p	4553	138	538	303.533333	0.01120951	15
mmu-miR-296-5p	4504	128	578	300.266667	0.01108887	15
mmu-miR-3475-3p	4485	98	686	299	0.01104209	15
mmu-miR-24-2-5p	4440	150	476	296	0.0109313	15
mmu-miR-3074-2-3p	4440	150	476	296	0.0109313	15
mmu-miR-346-5p	4380	125	518	292	0.01078358	15
mmu-miR-31-5p	4356	125	510	290.4	0.01072449	15
mmu-miR-671-3p	4322	103	586	288.133333	0.01064078	15
mmu-miR-142-5p	4316	173	758	287.733333	0.01062601	15
mmu-miR-187-3p	4178	121	467	278.533333	0.01028625	15
mmu-miR-379-3p	4151	140	435	276.733333	0.01021978	15
mmu-miR-129b-3p	4011	125	436	267.4	0.0098751	15
mmu-miR-676-5p	4007	95	495	267.133333	0.00986525	15
mmu-miR-210-3p	3844	126	453	256.266667	0.00946394	15
mmu-miR-497-5p	3741	110	447	249.4	0.00921036	15
mmu-miR-448-3p	3606	99	417	240.4	0.00887799	15
mmu-miR-486-3p	3557	88	447	237.133333	0.00875735	15
mmu-miR-133a-3p	3529	100	371	235.266667	0.00868841	15
mmu-miR-29c-5p	3501	93	469	233.4	0.00861948	15
mmu-miR-28a-5p	3408	77	482	227.2	0.00839051	15
mmu-miR-135b-5p	3385	109	373	225.666667	0.00833388	15
mmu-miR-337-3p	3382	140	351	225.466667	0.0083265	15
mmu-miR-30d-3p	3358	95	367	223.866667	0.00826741	15
mmu-miR-183-5p	3324	38	1084	221.6	0.0081837	15
mmu-miR-700-5p	3234	65	423	215.6	0.00796212	15
mmu-miR-221-5p	3161	83	469	210.733333	0.0077824	15
mmu-miR-433-5p	3117	87	367	207.8	0.00767407	15
mmu-miR-322-5p	3093	95	355	206.2	0.00761498	15
mmu-miR-324-3p	3084	79	312	205.6	0.00759282	15
mmu-miR-7a-2-3p	2959	78	299	197.266667	0.00728507	15
mmu-miR-19b-3p	2862	83	304	190.8	0.00704626	15
mmu-miR-1839-3p	2814	79	411	187.6	0.00692808	15
mmu-miR-6540-5p	2683	69	300	178.866667	0.00660556	15
mmu-miR-1251-5p	2673	70	323	178.2	0.00658094	15
mmu-miR-702-3p	2672	58	303	178.133333	0.00657848	15
mmu-let-7f-2-3p	2668	77	285	177.866667	0.00656863	15
mmu-miR-99a-3p	2647	86	328	176.466667	0.00651693	15
mmu-miR-339-5p	2647	78	310	176.466667	0.00651693	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-329-3p	2562	65	314	170.8	0.00630766	15
mmu-miR-141-3p	2436	33	610	162.4	0.00599744	15
mmu-miR-431-3p	2387	78	271	159.133333	0.0058768	15
mmu-miR-145a-3p	2353	78	254	156.866667	0.0057931	15
mmu-miR-30c-1-3p	2348	57	297	156.533333	0.00578079	15
mmu-miR-30c-2-3p	2343	63	271	156.2	0.00576848	15
mmu-miR-152-3p	2328	74	221	155.2	0.00573155	15
mmu-miR-376c-3p	2313	87	241	154.2	0.00569462	15
mmu-miR-3102-3p	2269	81	230	151.266667	0.00558629	15
mmu-miR-301b-3p	2258	79	262	150.533333	0.00555921	15
mmu-miR-677-5p	2243	75	271	149.533333	0.00552228	15
mmu-miR-34b-3p	2221	58	235	148.066667	0.00546811	15
mmu-miR-148a-5p	2053	71	212	136.866667	0.00505449	15
mmu-miR-760-3p	2014	50	220	134.266667	0.00495848	15
mmu-miR-488-5p	1969	61	233	131.266667	0.00484769	15
mmu-miR-1198-5p	1948	48	205	129.866667	0.00479598	15
mmu-miR-140-5p	1936	76	195	129.066667	0.00476644	15
mmu-let-7i-3p	1931	66	203	128.733333	0.00475413	15
mmu-miR-129-1-3p	1930	39	212	128.666667	0.00475167	15
mmu-miR-128-1-5p	1903	51	237	126.866667	0.00468519	15
mmu-miR-370-5p	1896	57	216	126.4	0.00466796	15
mmu-miR-1983	1890	65	224	126	0.00465319	15
mmu-let-7c-2-3p	1886	66	208	125.733333	0.00464334	15
mmu-let-7g-3p	1885	66	235	125.666667	0.00464088	15
mmu-miR-219b-5p	1868	49	221	124.533333	0.00459902	15
mmu-miR-674-3p	1838	46	345	122.533333	0.00452516	15
mmu-miR-500-3p	1838	64	167	122.533333	0.00452516	15
mmu-miR-33-5p	1835	41	231	122.333333	0.00451778	15
mmu-let-7a-1-3p	1826	67	174	121.733333	0.00449562	15
mmu-miR-3082-3p	1814	62	215	120.933333	0.00446608	15
mmu-miR-3068-5p	1812	65	206	120.8	0.00446115	15
mmu-miR-700-3p	1806	53	196	120.4	0.00444638	15
mmu-miR-199a-3p	1785	71	201	119	0.00439468	15
mmu-miR-99b-3p	1770	58	201	118	0.00435775	15
mmu-miR-345-5p	1758	30	232	117.2	0.0043282	15
mmu-miR-30f	1713	46	234	114.2	0.00421741	15
mmu-miR-21a-3p	1707	44	228	113.8	0.00420264	15
mmu-miR-218-1-3p	1687	54	194	112.466667	0.0041534	15
mmu-miR-130b-3p	1596	38	202	106.4	0.00392936	15
mmu-miR-134-3p	1588	44	196	105.866667	0.00390966	15
mmu-miR-219a-5p	1567	44	229	104.466667	0.00385796	15
mmu-miR-1981-5p	1554	42	189	103.6	0.00382595	15
mmu-let-7e-3p	1519	45	170	101.266667	0.00373978	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-7068-3p	1497	47	185	99.8	0.00368562	15
mmu-miR-339-3p	1480	41	161	98.6666667	0.00364377	15
mmu-miR-106b-5p	1471	46	177	98.0666667	0.00362161	15
mmu-miR-135a-2-3p	1444	39	224	96.2666667	0.00355513	15
mmu-miR-377-5p	1427	43	144	95.1333333	0.00351328	15
mmu-miR-665-3p	1414	45	153	94.2666667	0.00348127	15
mmu-miR-340-3p	1391	37	191	92.7333333	0.00342465	15
mmu-miR-3535	1352	51	154	90.1333333	0.00332863	15
mmu-miR-664-5p	1328	35	170	88.5333333	0.00326954	15
mmu-miR-22-5p	1289	42	183	85.9333333	0.00317352	15
mmu-miR-429-3p	1276	12	491	85.0666667	0.00314152	15
mmu-miR-342-5p	1243	16	186	82.8666667	0.00306027	15
mmu-miR-323-5p	1206	32	124	80.4	0.00296918	15
mmu-miR-671-5p	1202	42	131	80.1333333	0.00295933	15
mmu-miR-544-3p	1190	46	123	79.3333333	0.00292979	15
mmu-miR-877-5p	1184	26	182	78.9333333	0.00291501	15
mmu-miR-365-3p	1180	30	141	78.6666667	0.00290517	15
mmu-miR-296-3p	1176	43	119	78.4	0.00289532	15
mmu-miR-3074-1-3p	1168	25	133	77.8666667	0.00287562	15
mmu-miR-299b-5p	1165	33	160	77.6666667	0.00286824	15
mmu-miR-532-3p	1141	21	123	76.0666667	0.00280915	15
mmu-miR-378c	1140	37	153	76	0.00280668	15
mmu-miR-106b-3p	1131	31	134	75.4	0.00278453	15
mmu-miR-125a-3p	1124	29	135	74.9333333	0.00276729	15
mmu-miR-124-5p	1120	26	141	74.6666667	0.00275744	15
mmu-miR-101a-5p	1113	28	143	74.2	0.00274021	15
mmu-miR-3057-5p	1111	24	173	74.0666667	0.00273529	15
mmu-miR-216a-5p	1108	44	138	73.8666667	0.0027279	15
mmu-miR-7a-1-3p	1108	29	122	73.8666667	0.0027279	15
mmu-miR-200a-3p	1066	8	356	71.0666667	0.0026245	15
mmu-miR-3963	1060	16	162	70.6666667	0.00260972	15
mmu-miR-380-5p	1055	37	116	70.3333333	0.00259741	15
mmu-miR-144-3p	1049	39	145	69.9333333	0.00258264	15
mmu-miR-3102-3p-2-3p	1041	26	118	69.4	0.00256295	15
mmu-miR-15b-5p	1037	36	109	69.1333333	0.0025531	15
mmu-miR-325-3p	1033	39	103	68.8666667	0.00254325	15
mmu-miR-24-1-5p	1029	17	121	68.6	0.0025334	15
mmu-miR-184-3p	1013	22	119	67.5333333	0.00249401	15
mmu-miR-374b-3p	1006	31	123	67.0666667	0.00247678	15
mmu-miR-744-3p	1004	31	115	66.9333333	0.00247185	15
mmu-miR-142-3p	973	39	175	64.8666667	0.00239553	15
mmu-miR-17-5p	971	38	105	64.7333333	0.00239061	15
mmu-miR-29a-5p	969	38	95	64.6	0.00238568	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-28a-3p	958	30	110	63.8666667	0.0023586	15
mmu-miR-1264-3p	954	25	95	63.6	0.00234875	15
mmu-miR-32-5p	932	31	117	62.1333333	0.00229459	15
mmu-miR-467a-5p	931	25	89	62.0666667	0.00229213	15
mmu-miR-219c-3p	916	24	132	61.0666667	0.0022552	15
mmu-miR-3085-3p	903	22	98	60.2	0.00222319	15
mmu-miR-27b-5p	902	17	127	60.1333333	0.00222073	15
mmu-miR-325-5p	871	26	126	58.0666667	0.00214441	15
mmu-miR-449a-5p	871	20	109	58.0666667	0.00214441	15
mmu-miR-151-5p	870	23	120	58	0.00214194	15
mmu-miR-191-3p	863	26	102	57.5333333	0.00212471	15
mmu-miR-667-5p	850	25	90	56.6666667	0.0020927	15
mmu-miR-674-5p	843	23	99	56.2	0.00207547	15
mmu-miR-299a-3p	840	26	118	56	0.00206808	15
mmu-miR-185-3p	811	17	95	54.0666667	0.00199669	15
mmu-miR-199b-3p	808	27	100	53.8666667	0.0019893	15
mmu-miR-669c-5p	794	19	78	52.9333333	0.00195483	15
mmu-miR-344d-3-5p	782	19	111	52.1333333	0.00192529	15
mmu-miR-374b-5p	780	24	96	52	0.00192036	15
mmu-miR-144-5p	772	20	101	51.4666667	0.00190067	15
mmu-miR-670-3p	765	20	75	51	0.00188343	15
mmu-miR-34c-3p	763	19	74	50.8666667	0.00187851	15
mmu-miR-190a-5p	760	24	84	50.6666667	0.00187112	15
mmu-miR-219b-3p	751	24	110	50.0666667	0.00184897	15
mmu-miR-341-5p	740	27	94	49.3333333	0.00182188	15
mmu-miR-3084-3p	737	23	86	49.1333333	0.0018145	15
mmu-miR-412-5p	723	17	93	48.2	0.00178003	15
mmu-miR-345-3p	710	23	89	47.3333333	0.00174802	15
mmu-miR-1843a-3p	701	24	77	46.7333333	0.00172587	15
mmu-miR-877-3p	691	19	81	46.0666667	0.00170124	15
mmu-miR-322-3p	689	16	88	45.9333333	0.00169632	15
mmu-miR-362-3p	678	19	63	45.2	0.00166924	15
mmu-miR-6240	677	18	74	45.1333333	0.00166678	15
mmu-let-7f-1-3p	667	20	73	44.4666667	0.00164216	15
mmu-miR-193a-3p	657	17	81	43.8	0.00161754	15
mmu-miR-874-5p	655	9	75	43.6666667	0.00161261	15
mmu-miR-299a-5p	654	13	90	43.6	0.00161015	15
mmu-miR-98-3p	648	15	110	43.2	0.00159538	15
mmu-miR-374c-3p	635	17	83	42.3333333	0.00156337	15
mmu-miR-130b-5p	611	12	82	40.7333333	0.00150428	15
mmu-miR-199a-5p	606	19	86	40.4	0.00149197	15
mmu-miR-1224-3p	603	9	99	40.2	0.00148459	15
mmu-miR-341-3p	602	11	80	40.1333333	0.00148213	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-377-3p	582	21	65	38.8	0.00143289	15
mmu-miR-30b-3p	577	16	69	38.4666667	0.00142058	15
mmu-miR-539-5p	576	16	76	38.4	0.00141811	15
mmu-miR-425-3p	565	16	55	37.6666667	0.00139103	15
mmu-miR-127-5p	551	20	64	36.7333333	0.00135656	15
mmu-miR-544-5p	543	14	63	36.2	0.00133687	15
mmu-miR-6516-5p	543	13	82	36.2	0.00133687	15
mmu-miR-142b	532	23	99	35.4666667	0.00130979	15
mmu-miR-20a-5p	531	19	57	35.4	0.00130732	15
mmu-miR-3065-3p	530	18	67	35.3333333	0.00130486	15
mmu-miR-223-3p	528	13	184	35.2	0.00129994	15
mmu-miR-7015-3p	523	14	62	34.8666667	0.00128763	15
mmu-miR-7046-3p	520	11	108	34.6666667	0.00128024	15
mmu-miR-7080-3p	520	8	61	34.6666667	0.00128024	15
mmu-miR-378a-5p	516	12	58	34.4	0.00127039	15
mmu-miR-7689-3p	515	18	62	34.3333333	0.00126793	15
mmu-miR-3078-5p	505	14	77	33.6666667	0.00124331	15
mmu-miR-29b-2-5p	503	13	52	33.5333333	0.00123839	15
mmu-miR-152-5p	503	14	56	33.5333333	0.00123839	15
mmu-miR-3093-5p	484	13	51	32.2666667	0.00119161	15
mmu-miR-455-5p	474	12	49	31.6	0.00116699	15
mmu-miR-7224-3p	473	12	77	31.5333333	0.00116453	15
mmu-miR-344c-3p	473	14	58	31.5333333	0.00116453	15
mmu-miR-3072-3p	472	10	56	31.4666667	0.00116207	15
mmu-miR-489-3p	468	12	60	31.2	0.00115222	15
mmu-miR-7019-3p	463	4	71	30.8666667	0.00113991	15
mmu-miR-300-5p	454	12	57	30.2666667	0.00111775	15
mmu-miR-211-5p	447	16	58	29.8	0.00110052	15
mmu-miR-455-3p	438	6	81	29.2	0.00107836	15
mmu-miR-1981-3p	431	7	47	28.7333333	0.00106112	15
mmu-miR-33-3p	426	5	55	28.4	0.00104881	15
mmu-miR-26b-3p	421	9	50	28.0666667	0.0010365	15
mmu-miR-135b-3p	418	9	52	27.8666667	0.00102912	15
mmu-miR-6540-3p	409	8	53	27.2666667	0.00100696	15
mmu-miR-217-5p	401	10	54	26.7333333	0.00098726	15
mmu-miR-350-3p	398	18	38	26.5333333	0.00097988	15
mmu-miR-1247-5p	395	9	55	26.3333333	0.00097249	15
mmu-miR-504-5p	394	6	54	26.2666667	0.00097003	15
mmu-miR-3086-5p	393	14	43	26.2	0.00096757	15
mmu-miR-188-5p	388	12	44	25.8666667	0.00095526	15
mmu-miR-6989-3p	384	7	59	25.6	0.00094541	15
mmu-miR-138-1-3p	376	7	67	25.0666667	0.00092571	15
mmu-miR-7226-3p	366	12	36	24.4	0.00090109	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-540-5p	365	9	74	24.3333333	0.00089863	15
mmu-miR-216a-3p	360	9	43	24	0.00088632	15
mmu-miR-3069-3p	360	9	39	24	0.00088632	15
mmu-miR-7044-3p	357	13	41	23.8	0.00087894	15
mmu-miR-217-3p	356	7	52	23.7333333	0.00087647	15
mmu-miR-138-2-3p	356	8	46	23.7333333	0.00087647	15
mmu-miR-543-5p	355	10	35	23.6666667	0.00087401	15
mmu-miR-467e-5p	350	10	45	23.3333333	0.0008617	15
mmu-miR-7047-3p	344	8	44	22.9333333	0.00084693	15
mmu-miR-181b-1-3p	338	9	48	22.5333333	0.00083216	15
mmu-miR-1249-3p	335	11	38	22.3333333	0.00082477	15
mmu-miR-344f-3p	335	5	38	22.3333333	0.00082477	15
mmu-miR-8114	328	6	38	21.8666667	0.00080754	15
mmu-miR-331-5p	327	9	37	21.8	0.00080508	15
mmu-miR-154-3p	323	9	42	21.5333333	0.00079523	15
mmu-miR-1197-3p	320	10	45	21.3333333	0.00078784	15
mmu-miR-669a-5p	319	8	36	21.2666667	0.00078538	15
mmu-miR-155-5p	315	4	63	21	0.00077553	15
mmu-miR-200b-3p	309	1	86	20.6	0.00076076	15
mmu-miR-1982-3p	305	5	35	20.3333333	0.00075091	15
mmu-miR-15b-3p	302	8	31	20.1333333	0.00074353	15
mmu-miR-1943-5p	300	7	53	20	0.0007386	15
mmu-miR-6896-5p	295	3	56	19.6666667	0.00072629	15
mmu-miR-450a-5p	295	7	33	19.6666667	0.00072629	15
mmu-miR-669a-3p	292	8	36	19.4666667	0.00071891	15
mmu-miR-499-5p	277	5	30	18.4666667	0.00068198	15
mmu-miR-31-3p	276	5	37	18.4	0.00067951	15
mmu-miR-493-5p	276	3	27	18.4	0.00067951	15
mmu-miR-133b-3p	276	5	40	18.4	0.00067951	15
mmu-miR-222-5p	273	5	42	18.2	0.00067213	15
mmu-miR-6988-3p	272	8	29	18.1333333	0.00066967	15
mmu-miR-467d-5p	271	9	35	18.0666667	0.0006672	15
mmu-miR-7220-5p	271	5	29	18.0666667	0.0006672	15
mmu-miR-7052-3p	271	8	29	18.0666667	0.0006672	15
mmu-miR-381-5p	268	11	29	17.8666667	0.00065982	15
mmu-miR-491-5p	267	5	29	17.8	0.00065736	15
mmu-miR-3061-3p	267	4	43	17.8	0.00065736	15
mmu-miR-96-5p	252	7	27	16.8	0.00062043	15
mmu-miR-764-5p	244	2	36	16.2666667	0.00060073	15
mmu-miR-208b-3p	242	4	40	16.1333333	0.00059581	15
mmu-miR-1940	242	7	33	16.1333333	0.00059581	15
mmu-miR-3087-3p	241	5	31	16.0666667	0.00059334	15
mmu-miR-195a-3p	236	4	26	15.7333333	0.00058103	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-3544-5p	234	6	32	15.6	0.00057611	15
mmu-miR-188-3p	234	4	23	15.6	0.00057611	15
mmu-miR-383-3p	234	6	29	15.6	0.00057611	15
mmu-miR-3083-5p	230	3	34	15.3333333	0.00056626	15
mmu-let-7j	223	7	35	14.8666667	0.00054903	15
mmu-miR-6946-3p	222	5	26	14.8	0.00054656	15
mmu-miR-1264-5p	218	5	30	14.5333333	0.00053672	15
mmu-miR-6953-3p	217	5	25	14.4666667	0.00053425	15
mmu-miR-139-3p	214	2	23	14.2666667	0.00052687	15
mmu-miR-16-1-3p	212	5	28	14.1333333	0.00052194	15
mmu-miR-190b-5p	210	4	32	14	0.00051702	15
mmu-miR-1a-3p	208	6	29	13.8666667	0.0005121	15
mmu-miR-449c-5p	198	2	27	13.2	0.00048748	15
mmu-miR-539-3p	189	4	21	12.6	0.00046532	15
mmu-miR-128-2-5p	188	7	23	12.5333333	0.00046286	15
mmu-miR-107-5p	187	4	21	12.4666667	0.00046039	15
mmu-miR-218-2-3p	186	3	29	12.4	0.00045793	15
mmu-miR-362-5p	182	2	37	12.1333333	0.00044808	15
mmu-miR-216c-3p	182	2	37	12.1333333	0.00044808	15
mmu-miR-216b-5p	178	5	27	11.8666667	0.00043824	15
mmu-miR-6769b-3p	178	2	27	11.8666667	0.00043824	15
mmu-miR-3060-3p	178	4	23	11.8666667	0.00043824	15
mmu-miR-137-5p	174	2	20	11.6	0.00042839	15
mmu-miR-186-3p	173	4	23	11.5333333	0.00042593	15
mmu-miR-1188-5p	168	3	21	11.2	0.00041362	15
mmu-miR-6971-3p	165	3	22	11	0.00040623	15
mmu-miR-3102-5p-2-5p	164	2	26	10.9333333	0.00040377	15
mmu-miR-18a-5p	164	5	23	10.9333333	0.00040377	15
mmu-miR-6418-3p	164	4	23	10.9333333	0.00040377	15
mmu-miR-17-3p	163	2	29	10.8666667	0.00040131	15
mmu-miR-6948-3p	163	2	22	10.8666667	0.00040131	15
mmu-miR-210-5p	163	2	29	10.8666667	0.00040131	15
mmu-miR-344f-5p	163	2	24	10.8666667	0.00040131	15
mmu-miR-6958-3p	159	1	21	10.6	0.00039146	15
mmu-miR-92b-5p	158	5	16	10.5333333	0.000389	15
mmu-miR-8103	151	5	21	10.0666667	0.00037176	15
mmu-miR-19a-3p	150	2	20	10	0.0003693	15
mmu-miR-135a-1-3p	150	3	23	10	0.0003693	15
mmu-miR-344e-3p	149	1	34	9.93333333	0.00036684	15
mmu-miR-8111	142	3	21	9.46666667	0.0003496	15
mmu-miR-200c-3p	142	3	22	9.46666667	0.0003496	15
mmu-miR-3069-5p	138	2	18	9.2	0.00033976	15
mmu-miR-204-3p	138	1	27	9.2	0.00033976	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-208a-5p	137	2	19	9.13333333	0.00033729	15
mmu-miR-205-5p	136	3	20	9.06666667	0.00033483	15
mmu-miR-187-5p	136	2	21	9.06666667	0.00033483	15
mmu-miR-501-5p	134	2	17	8.93333333	0.00032991	15
mmu-miR-1191b-5p	131	3	15	8.73333333	0.00032252	15
mmu-miR-760-5p	131	3	17	8.73333333	0.00032252	15
mmu-miR-495-5p	128	4	15	8.53333333	0.00031514	15
mmu-miR-1193-3p	128	2	18	8.53333333	0.00031514	15
mmu-miR-3084-5p	127	3	16	8.46666667	0.00031267	15
mmu-miR-199b-5p	127	2	15	8.46666667	0.00031267	15
mmu-miR-505-3p	127	2	15	8.46666667	0.00031267	15
mmu-let-7a-2-3p	127	2	18	8.46666667	0.00031267	15
mmu-miR-505-5p	126	1	15	8.4	0.00031021	15
mmu-miR-7080-5p	126	1	17	8.4	0.00031021	15
mmu-miR-7043-3p	124	1	15	8.26666667	0.00030529	15
mmu-miR-3061-5p	123	4	13	8.2	0.00030283	15
mmu-miR-26a-2-3p	119	2	12	7.93333333	0.00029298	15
mmu-miR-672-3p	115	1	16	7.66666667	0.00028313	15
mmu-miR-764-3p	115	2	18	7.66666667	0.00028313	15
mmu-miR-491-3p	112	1	16	7.46666667	0.00027574	15
mmu-miR-301a-5p	112	1	16	7.46666667	0.00027574	15
mmu-miR-7035-3p	112	2	16	7.46666667	0.00027574	15
mmu-miR-6985-3p	111	3	13	7.4	0.00027328	15
mmu-miR-92a-1-5p	110	2	16	7.33333333	0.00027082	15
mmu-miR-7688-5p	110	2	12	7.33333333	0.00027082	15
mmu-miR-3077-3p	109	1	13	7.26666667	0.00026836	15
mmu-miR-7006-3p	109	1	18	7.26666667	0.00026836	15
mmu-miR-6913-3p	107	3	10	7.13333333	0.00026343	15
mmu-miR-7093-3p	106	3	12	7.06666667	0.00026097	15
mmu-miR-1968-5p	105	2	14	7	0.00025851	15
mmu-miR-6899-3p	103	2	10	6.86666667	0.00025359	15
mmu-miR-1306-5p	102	1	12	6.8	0.00025112	15
mmu-miR-5615-5p	102	2	18	6.8	0.00025112	15
mmu-miR-100-3p	101	3	18	6.73333333	0.00024866	15
mmu-let-7c-1-3p	98	2	16	6.53333333	0.00024128	15
mmu-miR-18a-3p	98	1	11	6.53333333	0.00024128	15
mmu-miR-410-5p	96	2	13	6.4	0.00023635	15
mmu-miR-879-3p	94	1	16	6.26666667	0.00023143	15
mmu-miR-467c-5p	94	1	13	6.26666667	0.00023143	15
mmu-miR-7235-3p	93	1	11	6.2	0.00022897	15
mmu-miR-467b-5p	90	2	10	6	0.00022158	15
mmu-miR-542-3p	90	1	13	6	0.00022158	15
mmu-miR-7116-3p	89	1	13	5.93333333	0.00021912	15

Continuación tabla suplementaria 4

microRNA	suma	min	max	promedio	porcentaje	# muestras
mmu-miR-467a-3p	88	1	23	5.86666667	0.00021666	15
mmu-miR-219a-1-3p	87	1	11	5.8	0.00021419	15
mmu-miR-27a-5p	86	1	13	5.73333333	0.00021173	15
mmu-miR-669d-5p	86	1	10	5.73333333	0.00021173	15
mmu-miR-7008-3p	85	1	13	5.66666667	0.00020927	15
mmu-miR-1949	84	2	12	5.6	0.00020681	15
mmu-miR-5100	82	1	11	5.46666667	0.00020188	15
mmu-miR-3076-3p	75	1	11	5	0.00018465	15
mmu-miR-7070-3p	72	2	11	4.8	0.00017726	15
mmu-miR-150-3p	72	2	11	4.8	0.00017726	15
mmu-miR-378b	72	3	9	4.8	0.00017726	15
mmu-miR-1912-3p	69	1	13	4.6	0.00016988	15
mmu-miR-450b-5p	68	1	9	4.53333333	0.00016742	15
mmu-miR-1964-3p	66	2	6	4.4	0.00016249	15
mmu-miR-669b-5p	65	1	12	4.33333333	0.00016003	15
mmu-miR-7b-3p	65	1	10	4.33333333	0.00016003	15
mmu-miR-3103-3p	64	1	9	4.26666667	0.00015757	15
mmu-miR-216b-3p	63	1	10	4.2	0.00015511	15
mmu-miR-216c-5p	62	1	8	4.13333333	0.00015264	15
mmu-miR-190a-3p	62	1	7	4.13333333	0.00015264	15
mmu-miR-5621-3p	61	1	9	4.06666667	0.00015018	15
mmu-miR-551b-3p	59	1	11	3.93333333	0.00014526	15
mmu-miR-6990-3p	57	1	9	3.8	0.00014033	15
mmu-miR-15a-3p	53	1	15	3.53333333	0.00013049	15
mmu-miR-5615-3p	52	1	8	3.46666667	0.00012802	15
mmu-miR-3106-5p	51	1	9	3.4	0.00012556	15
mmu-miR-669o-5p	49	1	7	3.26666667	0.00012064	15
mmu-miR-8112	48	1	8	3.2	0.00011818	15
mmu-miR-1948-3p	48	1	7	3.2	0.00011818	15
mmu-miR-202-5p	47	1	8	3.13333333	0.00011571	15
mmu-miR-147-3p	47	1	9	3.13333333	0.00011571	15
mmu-miR-551b-5p	45	1	7	3	0.00011079	15
mmu-miR-122-5p	44	1	11	2.93333333	0.00010833	15
mmu-miR-1b-5p	41	1	4	2.73333333	0.00010094	15
mmu-miR-669p-5p	30	1	4	2	7.386E-05	15

microRNAs encontrados en la secuenciación de RNAs pequeños de las 15 muestras de hipotálamo de ratón. Se muestra la suma de lecturas de las 15 muestras, el número mínimo y máximo de lecturas para cada muestra, el promedio de lecturas y el porcentaje de las lecturas totales. Solo se incluyeron los microRNAs identificados en las 15 muestras.

Tabla suplementaria 5 – Expresión diferencial de microRNAs entre los grupos experimentales

DN AN vs DN AE

microRNA	Cambio de expresión
miR-540-5p	2.58058378
miR-143-3p	1.248725759
miR-410-3p	1.246334132
miR-30a-5p	1.236251998
miR-3107-3p	1.191210679
miR-486-5p	1.191210679
miR-181c-5p	1.190070248
miR-409-5p	0.471138399

vs. DN AN

DN AN vs DAG AN

microRNA	Cambio de expresión
miR-96-5p	8.473446152
miR-1949	4.567404262
miR-183-5p	2.553625988
miR-7046-3p	2.381219806
miR-375-3p	1.934044032
miR-151-3p	1.657723951
miR-338-3p	1.421040521
miR-3065-5p	1.405563716
miR-148a-3p	1.324862291
miR-29a-3p	0.859807818
miR-3071-5p	0.852895288
miR-345-5p	0.471189118
miR-505-3p	0.301188447

vs. DN AN

DN AE vs DAG AN

microRNA	Cambio de expresión
miR-210-5p	2.986707244
miR-26a-1-3p	2.978961305
miR-96-5p	2.604819956
miR-501-3p	2.604495614
miR-409-5p	2.344314316
miR-183-5p	2.295969981
miR-200a-3p	2.16924851
miR-423-5p	2.019562684
miR-671-3p	1.943149352
miR-674-3p	1.89827967
miR-146a-5p	1.883913798
miR-28a-5p	1.869746416
miR-92a-3p	1.401303299
miR-338-3p	1.343245319
miR-3065-5p	1.336115817
miR-410-3p	0.819097608
miR-381-3p	0.80714933
miR-30a-5p	0.799814233
miR-3071-5p	0.763485376
miR-143-3p	0.761057862
miR-3107-3p	0.753416442
miR-486-5p	0.753416442
miR-3107-5p	0.753074353
miR-181c-5p	0.743359663
miR-326-3p	0.523996395
miR-345-5p	0.482608671
miR-540-5p	0.420540205
miR-466n-5p	0.222769637
miR-1927	0.218814962

vs. DN AE

DAG AN vs DAG AE 1M

microRNA	Cambio de expresión
miR-505-3p	2.814871657
miR-188-3p	2.499017208
miR-24-1-5p	1.942315207
miR-544-3p	1.77599875
miR-337-3p	1.773642009
miR-3074-1-3p	1.766367995
miR-21a-3p	1.679334956
miR-451a	1.631701733
miR-874-3p	1.629386001
miR-154-5p	1.616499309
miR-34b-5p	1.581557735
miR-3071-5p	1.224177807
miR-181c-5p	1.184430298
miR-434-3p	0.699605132
miR-151-3p	0.692138292
miR-92a-3p	0.675781001
miR-181b-5p	0.663914206
miR-125b-1-3p	0.643190374
miR-212-5p	0.643111878
miR-344d-3p	0.616732495
miR-125a-5p	0.604850474
miR-423-3p	0.586699766
miR-671-3p	0.574463666
miR-342-5p	0.564144963
miR-384-5p	0.562643597
miR-146a-5p	0.560925715
miR-3475-3p	0.534805525
miR-7224-3p	0.518848363
miR-125b-5p	0.490611103
miR-99b-5p	0.489531558
miR-151-5p	0.483676022
miR-455-3p	0.471426857
miR-485-5p	0.469463353
miR-27b-5p	0.466246246
miR-7046-3p	0.463200275
miR-182-5p	0.452304639
miR-423-5p	0.448696977
miR-674-3p	0.447211509
miR-429-3p	0.404095571
miR-100-5p	0.375562939
miR-7019-3p	0.362089829
miR-210-5p	0.32649702
miR-501-3p	0.318524403
miR-200b-3p	0.309496274
miR-183-5p	0.288397113
miR-96-5p	0.27697973
miR-409-5p	0.233944455
miR-200a-3p	0.214840706
miR-1964-3p	0.201832351
miR-93-3p	0.085834706

vs. DAG AN

DAG AN vs DAG AE 3M

microRNA	Cambio de expresión
miR-223-3p	3.875270967
miR-142b	2.29529346
miR-142-3p	2.009026804
miR-125a-5p	0.709583603
miR-125b-5p	0.627908399
miR-674-3p	0.503588697
miR-99b-5p	0.467756259
miR-455-3p	0.45596281
miR-7046-3p	0.454800489
miR-6896-5p	0.422951444
miR-100-5p	0.379612612
miR-3069-5p	0.375861655
miR-7019-3p	0.374094864
miR-501-3p	0.31297098
miR-1949	0.276856255
miR-409-5p	0.23338414

vs. DAG AN

DAG AE 1M vs DAG AE 3M

microRNA	Cambio de expresión
miR-200a-3p	5.801448627
miR-200b-3p	5.099425432
miR-429-3p	3.97004396
miR-182-5p	3.514275462
miR-183-5p	3.343532899
miR-96-5p	2.594754058
miR-223-3p	2.399744737
miR-155-5p	2.301354238
miR-384-5p	1.708712077
miR-141-3p	1.695387649
miR-146a-5p	1.618617712
let-7d-5p	1.515639194
miR-181a-5p	1.375088665
miR-92b-3p	1.362811787
miR-181b-5p	1.326166949
miR-92a-3p	1.324558911
let-7f-5p	1.30970474
let-7a-5p	1.30970474
miR-125b-5p	1.283837201
miR-128-3p	1.245562805
miR-125a-5p	1.177466401
let-7i-5p	1.174254907
miR-410-3p	1.165955589
miR-3071-5p	0.887796717
miR-127-3p	0.803210689
miR-1949	0.219699021

vs. DAG AE 1M

Cambio en la expresión obtenido de las comparaciones pareadas de los microRNAs identificados como diferencialmente expresados por alguna de las 3 bibliotecas de R utilizadas en el estudio.

Tabla suplementaria 6 – microRNAs diferencialmente expresados en nuestras condiciones

	DNAE	DNAN	DAGAN	DAGAE1M	DAGAE3M
mmu-miR-181a-5p	67381	60160	73517	56349	82032
mmu-miR-434-3p	28773	24802	31842	21506	23908
mmu-miR-125a-5p	12212	12810	14227	8381	10172
mmu-miR-99b-5p	9590	14556	13663	5882	6610
mmu-miR-125b-5p	10024	12958	15117	7087	9733
mmu-miR-100-5p	4802	7415	7760	2496	3059
mmu-miR-181b-5p	4745	4554	6909	4412	6198
mmu-miR-151-3p	2470	2092	3479	2318	2817
mmu-let-7d-5p	1485	1970	1850	1410	2248
mmu-miR-92a-3p	1621	1521	2291	1501	2004
mmu-miR-384-5p	795	1164	1236	668	1191
mmu-miR-182-5p	619	447	797	324	1441
mmu-miR-326-3p	1095	1087	588	760	432
mmu-miR-331-3p	652	650	441	552	314
mmu-miR-409-5p	212	533	538	99	136
mmu-miR-146a-5p	195	213	384	205	333
mmu-miR-501-3p	145	276	409	111	136
mmu-miR-154-5p	199	226	138	218	167
mmu-miR-485-5p	130	157	223	101	168
mmu-miR-423-3p	97	125	178	102	147
mmu-miR-423-5p	91	114	189	84	140
mmu-miR-3475-3p	92	110	158	84	102
mmu-miR-671-3p	77	92	149	80	120
mmu-miR-337-3p	84	96	61	104	82
mmu-miR-183-5p	55	48	115	29	129
mmu-miR-344d-3p	203	207	286	171	251
mmu-miR-674-3p	36	45	73	31	39
mmu-miR-429-3p	18	25	31	12	58
mmu-miR-200a-3p	16	20	32	6	46
mmu-miR-27b-5p	19	22	30	13	23
mmu-miR-151-5p	16	22	31	14	22
mmu-miR-223-3p	11	9	8	13	22
mmu-miR-7046-3p	12	9	22	10	10
mmu-miR-7019-3p	9	12	20	7	8
mmu-miR-200b-3p	6	7	7	2	13
mmu-miR-96-5p	4	2	11	3	9
mmu-miR-210-5p	2	5	7	2	4
mmu-miR-205-5p	3	2	3	4	6
mmu-miR-1949	1	1	4	5	1
mmu-miR-1b-5p	1	0	2	2	3
mmu-miR-93-3p	0	1	1	0	1

Lecturas promedio normalizadas para los 41 microRNAs que se determinaron como diferencialmente expresados por 2 de los métodos (EdgeR, DESeq o NOISeq) utilizados en el estudio.

Tabla suplementaria 7 – Análisis de enriquecimiento de vías para los blancos predichos de los microRNAs del Clúster 2 (Tabla completa)

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
1	MicroRNAs en cáncer	mmu05206	141	40	17.6771	2.2628	3.18E-07	0.0001
2	Proteólisis mediada por ubiquitina	mmu04120	140	39	17.5517	2.2220	7.44E-07	0.0001
3	Invasión bacteriana de células epiteliales	mmu05100	78	25	9.7788	2.5565	4.93E-06	0.0005
4	Vías en cáncer	mmu05200	395	79	49.5209	1.5953	1.08E-05	0.0008
5	Vía de señalización de FoxO	mmu04068	134	34	16.7995	2.0239	3.36E-05	0.0020
6	Vía de señalización de Ras	mmu04014	230	50	28.8349	1.7340	5.25E-05	0.0026
7	Meiosis de ovocitos	mmu04114	116	30	14.5428	2.0629	6.57E-05	0.0028
8	Hepatitis B	mmu05161	145	35	18.1785	1.9253	7.89E-05	0.0029
9	Vía de señalización de p53	mmu04115	68	20	8.5251	2.3460	1.66E-04	0.0053
10	Proteoglicanos en cáncer	mmu05205	204	44	25.5753	1.7204	1.76E-04	0.0053
11	Vía de señalización de AMPK	mmu04152	129	31	16.1726	1.9168	2.17E-04	0.0059
12	Vía de señalización de Hippo	mmu04390	154	35	19.3069	1.8128	2.80E-04	0.0070
13	Vía de señalización de ErbB	mmu04012	87	23	10.9071	2.1087	3.22E-04	0.0074
14	Adicción a anfetaminas	mmu05031	68	19	8.5251	2.2287	4.94E-04	0.0105
15	Cáncer de pulmón de células pequeñas	mmu05222	85	22	10.6564	2.0645	5.92E-04	0.0118
16	Cáncer colorrectal	mmu05210	64	18	8.0236	2.2434	6.32E-04	0.0118
17	Vía de señalización de insulina	mmu04910	143	32	17.9278	1.7849	6.71E-04	0.0118
18	Vía de señalización de fosfolipasa D	mmu04072	145	32	18.1785	1.7603	8.63E-04	0.0139
19	Ritmo circadiano	mmu04710	31	11	3.8864	2.8303	8.84E-04	0.0139
20	Sinapsis Dopaminérgica	mmu04728	134	30	16.7995	1.7858	9.68E-04	0.0145
21	Biosíntesis de glucoesfingolípidos	mmu00601	27	10	3.3850	2.9542	1.03E-03	0.0147
22	Vía de señalización de PI3K-Akt	mmu04151	345	63	43.2524	1.4566	1.12E-03	0.0149
23	Maduración de ovocitos mediada por Progesterona	mmu04914	89	22	11.1579	1.9717	1.15E-03	0.0149
24	Apoptosis	mmu04215	32	11	4.0118	2.7419	1.20E-03	0.0149
25	Interacción de SNAREs en tráfico vesicular	mmu04130	33	11	4.1372	2.6588	1.59E-03	0.0191
26	Vía de señalización de MAPK	mmu04010	252	48	31.5931	1.5193	1.75E-03	0.0201
27	Endocitosis	mmu04144	286	53	35.8556	1.4782	1.95E-03	0.0207
28	Guiado axonal	mmu04360	177	36	22.1904	1.6223	2.01E-03	0.0207
29	Desregulación de la transcripción en cáncer	mmu05202	177	36	22.1904	1.6223	2.01E-03	0.0207
30	Resistencia a la inhibición de EGFR	mmu01521	82	20	10.2803	1.9455	2.26E-03	0.0225
31	Cáncer pancreático	mmu05212	66	17	8.2744	2.0545	2.54E-03	0.0237
32	Glioma	mmu05214	66	17	8.2744	2.0545	2.54E-03	0.0237
33	Cáncer de próstata	mmu05215	89	21	11.1579	1.8821	2.74E-03	0.0242
34	Depresión a largo plazo	mmu04730	61	16	7.6475	2.0922	2.75E-03	0.0242
35	Metabolismo de colina en cáncer	mmu05231	101	23	12.6623	1.8164	2.88E-03	0.0246
36	Vía de señalización de Hippo – múltiples especies	mmu04392	26	9	3.2596	2.7611	3.15E-03	0.0252
37	Leucemia crónica mieloide	mmu05220	73	18	9.1520	1.9668	3.23E-03	0.0252
38	Vía de señalización de Glucagón	mmu04922	102	23	12.7877	1.7986	3.29E-03	0.0252
39	Señalización de AGE-RAGE en complicaciones diabéticas	mmu04933	102	23	12.7877	1.7986	3.29E-03	0.0252
40	Secreción de ácido gástrico	mmu04971	74	18	9.2773	1.9402	3.78E-03	0.0279

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
41	Cáncer de endometrio	mmu05213	52	14	6.5192	2.1475	3.84E-03	0.0279
42	Vía de señalización de Wnt	mmu04310	146	30	18.3039	1.6390	3.92E-03	0.0279
43	Metabolismo de Butanoato	mmu00650	27	9	3.3850	2.6588	4.20E-03	0.0292
44	Regulación del citoesqueleto de actina	mmu04810	218	41	27.3305	1.5002	4.62E-03	0.0314
45	Vía de señalización de Hedgehog	mmu04340	44	12	5.5162	2.1754	6.44E-03	0.0428

Vías enriquecidas con un FDR<0.05

Tabla suplementaria 8 – Análisis de enriquecimiento de vías para los blancos predichos de los microRNAs del Clúster 3 (Tabla completa)

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
1	Vías en cáncer	mmu05200	395	101	44.2441	2.2828	2.22E-16	6.64E-14
2	Cáncer de mama	mmu05224	146	48	16.3535	2.9352	1.42E-12	2.12E-10
3	Vía de señalización de Hippo	mmu04390	154	46	17.2496	2.6667	1.71E-10	1.71E-08
4	Proteoglucanos en cáncer	mmu05205	204	54	22.8501	2.3632	6.69E-10	5.00E-08
5	Vías de señalización que regulan la pluripotencia de células troncales	mmu04550	140	42	15.6814	2.6783	9.32E-10	5.54E-08
6	Vía de señalización de Wnt	mmu04310	146	43	16.3535	2.6294	1.11E-09	5.54E-08
7	Vía de señalización de AMPc	mmu04024	199	51	22.2900	2.2880	6.72E-09	2.87E-07
8	Melanogénesis	mmu04916	100	32	11.2010	2.8569	1.70E-08	6.37E-07
9	Vía de señalización de Estrógeno	mmu04915	98	31	10.9770	2.8241	3.87E-08	1.28E-06
10	Vía de señalización de Ras	mmu04014	230	54	25.7624	2.0961	6.30E-08	1.88E-06
11	Vía de señalización de ErbB	mmu04012	87	28	9.7449	2.8733	1.17E-07	3.17E-06
12	MicroRNAs en cáncer	mmu05206	141	38	15.7934	2.4061	1.43E-07	3.30E-06
13	Leucemia crónica mieloide	mmu05220	73	25	8.1768	3.0574	1.43E-07	3.30E-06
14	Cáncer Colorrectal	mmu05210	64	23	7.1687	3.2084	1.66E-07	3.45E-06
15	Cáncer de células basales	mmu05217	55	21	6.1606	3.4088	1.73E-07	3.45E-06
16	Cáncer de endometrio	mmu05213	52	20	5.8245	3.4338	2.96E-07	5.53E-06
17	Leucemia mieloide aguda	mmu05221	57	21	6.3846	3.2892	3.52E-07	6.19E-06
18	Glioma	mmu05214	66	22	7.3927	2.9759	1.36E-06	2.19E-05
19	Guiado axonal	mmu04360	177	42	19.8258	2.1184	1.39E-06	2.19E-05
20	Cáncer de próstata	mmu05215	89	26	9.9689	2.6081	2.64E-06	3.95E-05
21	Sinapsis Dopaminérgica	mmu04728	134	34	15.0094	2.2653	2.90E-06	3.96E-05
22	Resistencia Endocrina	mmu01522	95	27	10.6410	2.5374	3.06E-06	3.96E-05
23	Vía de señalización de Prolactina	mmu04917	74	23	8.2888	2.7748	3.10E-06	3.96E-05
24	Vía de señalización de Neurotrofinas	mmu04722	123	32	13.7773	2.3227	3.18E-06	3.96E-05
25	Cáncer pancreático	mmu05212	66	21	7.3927	2.8406	5.48E-06	6.55E-05
26	Vía de señalización de PI3K-Akt	mmu04151	345	66	38.6435	1.7079	6.61E-06	7.45E-05
27	Vía de señalización de Fosfolipasa D	mmu04072	145	35	16.2415	2.1550	7.01E-06	7.45E-05
28	Infección con HTLV-I	mmu05166	285	57	31.9229	1.7856	7.20E-06	7.45E-05
29	Vía de señalización de MAPK	mmu04010	252	52	28.2266	1.8422	7.22E-06	7.45E-05
30	Vía de señalización de del receptor de células T	mmu04660	105	28	11.7611	2.3807	7.83E-06	7.80E-05
31	Vía de señalización de FoxO	mmu04068	134	33	15.0094	2.1986	8.10E-06	7.82E-05
32	Vía de señalización de AMPK	mmu04152	129	32	14.4493	2.2146	9.43E-06	8.81E-05
33	Sinapsis colinérgica	mmu04725	112	29	12.5452	2.3117	1.01E-05	9.17E-05
34	Señalización de AGE-RAGE en complicaciones diabéticas	mmu04933	102	27	11.4250	2.3632	1.31E-05	1.14E-04
35	Vía de señalización de Insulina	mmu04910	143	34	16.0175	2.1227	1.34E-05	1.14E-04
36	Vía de señalización de mTOR	mmu04150	156	36	17.4736	2.0603	1.53E-05	1.27E-04
37	Vía de señalización de quimiocinas	mmu04062	196	42	21.9540	1.9131	2.14E-05	1.73E-04
38	Adhesión Focal	mmu04510	203	43	22.7381	1.8911	2.30E-05	1.81E-04
39	Metabolismo de Colina en cáncer	mmu05231	101	26	11.3130	2.2982	3.22E-05	2.47E-04
40	Vía de señalización del receptor de células B	mmu04662	74	21	8.2888	2.5336	3.88E-05	2.90E-04

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
41	Vía de señalización de Rap1	mmu04015	215	44	24.0822	1.8271	4.50E-05	3.28E-04
42	Hepatitis B	mmu05161	145	33	16.2415	2.0318	4.63E-05	3.29E-04
43	Vía de señalización de Fc epsilon RI	mmu04664	70	20	7.8407	2.5508	5.31E-05	3.63E-04
44	Arrastre circadiano	mmu04713	98	25	10.9770	2.2775	5.35E-05	3.63E-04
45	Resistencia a la inhibición de EGFR	mmu01521	82	22	9.1848	2.3953	6.56E-05	4.35E-04
46	Vía de señalización de hormonas tiroideas	mmu04919	117	28	13.1052	2.1366	6.73E-05	4.35E-04
47	Vía de señalización de GMPc-PKG	mmu04022	173	37	19.3778	1.9094	6.84E-05	4.35E-04
48	Vía de señalización de Esfingolípidos	mmu04071	124	29	13.8893	2.0879	7.85E-05	4.89E-04
49	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	mmu05223	56	17	6.2726	2.7102	8.32E-05	5.08E-04
50	Invasión bacteriana de células epiteliales	mmu05100	78	21	8.7368	2.4036	9.05E-05	5.41E-04
51	Hepatitis C	mmu05160	136	30	15.2334	1.9694	1.84E-04	1.08E-03
52	Sinapsis GABAérgica	mmu04727	88	22	9.8569	2.2319	2.03E-04	1.17E-03
53	Vía de señalización de VEGF	mmu04370	60	17	6.7206	2.5295	2.13E-04	1.20E-03
54	Interacción neuroactiva ligando-receptor	mmu04080	285	52	31.9229	1.6289	2.24E-04	1.24E-03
55	Vía de señalización de GnRH	mmu04912	89	22	9.9689	2.2069	2.42E-04	1.32E-03
56	Diferenciación de Osteoclastos	mmu04380	132	29	14.7854	1.9614	2.52E-04	1.34E-03
57	Regulación del citoesqueleto de actina	mmu04810	218	42	24.4182	1.7200	2.72E-04	1.42E-03
58	Señalización adrenérgica en cardiomiocitos	mmu04261	152	32	17.0256	1.8795	2.82E-04	1.45E-03
59	Adicción a morfina	mmu05032	92	22	10.3049	2.1349	4.00E-04	2.03E-03
60	Endocitosis	mmu04144	286	51	32.0349	1.5920	4.53E-04	2.26E-03
61	Melanoma	mmu05218	71	18	7.9527	2.2634	6.28E-04	3.08E-03
62	Regulación de la longevidad	mmu04211	95	22	10.6410	2.0675	6.42E-04	3.09E-03
63	Vía de señalización de Oxitocina	mmu04921	159	32	17.8096	1.7968	6.50E-04	3.09E-03
64	Cáncer de células renales	mmu05211	67	17	7.5047	2.2653	8.73E-04	4.08E-03
65	Vía de señalización de Fosfatidilinositol	mmu04070	98	22	10.9770	2.0042	1.00E-03	4.61E-03
66	Fagocitosis mediada por Fc gamma R	mmu04666	89	20	9.9689	2.0062	1.65E-03	7.47E-03
67	Señalización endocannabinoide retrograda	mmu04723	102	22	11.4250	1.9256	1.74E-03	7.78E-03
68	Metabolismo de Esfingolípidos	mmu00600	48	13	5.3765	2.4179	1.83E-03	8.04E-03
69	Vía de señalización de Calcio	mmu04020	183	34	20.4979	1.6587	1.93E-03	8.35E-03
70	Enfermedad de Chagas	mmu05142	103	22	11.5371	1.9069	1.99E-03	8.50E-03
71	Secreción de Renina	mmu04924	72	17	8.0647	2.1079	2.05E-03	8.53E-03
72	Metabolismo central de carbohidratos en cáncer	mmu05230	66	16	7.3927	2.1643	2.05E-03	8.53E-03
73	Cáncer de pulmón de células pequeñas	mmu05222	85	19	9.5209	1.9956	2.28E-03	9.33E-03
74	Vía de señalización de Hedgehog	mmu04340	44	12	4.9285	2.4348	2.54E-03	1.02E-02
75	Apoptosis	mmu04210	138	27	15.4574	1.7467	2.56E-03	1.02E-02
76	Uniones Adherentes	mmu04520	74	17	8.2888	2.0510	2.80E-03	1.10E-02
77	Regulación de la lipólisis en adipocitos	mmu04923	57	14	6.3846	2.1928	3.36E-03	1.31E-02
78	Regulación de la longevidad - múltiples especies	mmu04213	64	15	7.1687	2.0924	3.96E-03	1.52E-02
79	Resistencia a la insulina	mmu04931	111	22	12.4331	1.7695	5.23E-03	1.98E-02
80	Potenciación a largo plazo	mmu04720	67	15	7.5047	1.9988	6.25E-03	2.34E-02
81	Secreción de ácido gástrico	mmu04971	74	16	8.2888	1.9303	6.88E-03	2.54E-02
82	Vía de señalización de TNF	mmu04668	109	21	12.2091	1.7200	8.74E-03	3.19E-02

	Vía KEGG	ID KEGG	Genes en la vía	Blancos en la vía	Genes esperados	Enriquecimiento	P-value	FDR
83	Cáncer de tiroides	mmu05216	29	8	3.2483	2.4628	1.20E-02	4.33E-02
84	Vía de señalización de adipocinas	mmu04920	72	15	8.0647	1.8599	1.23E-02	4.38E-02

Vías enriquecidas con un FDR<0.05

Tabla suplementaria 9 – blancos predichos en la vía de insulina para los microRNAs encontrados en el estudio

Gen	mmu-miR-100	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-409-5p	mmu-miR-501-3p	mmu-miR-674-3p	mmu-miR-99a	mmu-miR-182	mmu-miR-183	mmu-miR-1b-5p	mmu-miR-200a	mmu-miR-200b	mmu-miR-205	mmu-miR-223	mmu-miR-429	mmu-miR-146a	mmu-miR-151-3p	mmu-miR-151-5p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-423-5p	mmu-miR-485	mmu-miR-671-3p	mmu-miR-92a	mmu-miR-96	
Acaca	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
Acacb	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
Akt1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
Akt2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	
Akt3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
Araf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Braf	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
Calm1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	
Calm2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Calm3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	
Calm4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Calm5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Calml3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Calml4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	
Cbl	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	
Cblb	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	
Crk	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	
Crkl	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	
Eif4e	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
Eif4e1b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Eif4e2	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Eif4ebp1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	
Elk1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	
Exoc7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fasn	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Fbp1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fbp2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Flot1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
Flot2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	
Foxo1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
G6pc	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	
G6pc2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	
G6pc3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Gck	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
Grb2	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	

Gen	mmu-miR-100	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-409-5p	mmu-miR-501-3p	mmu-miR-674-3p	mmu-miR-99a	mmu-miR-182	mmu-miR-183	mmu-miR-1b-5p	mmu-miR-200a	mmu-miR-200b	mmu-miR-205	mmu-miR-223	mmu-miR-429	mmu-miR-146a	mmu-miR-151-3p	mmu-miR-151-5p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-423-5p	mmu-miR-485	mmu-miR-671-3p	mmu-miR-92a	mmu-miR-96
Gsk3b	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Gys1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Gys2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hk1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hk2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1
Hk3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hkdc1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ikbb	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Inpp5a	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Inpp1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ins1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
Ins2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insr	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Irs1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
Irs2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irs3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irs4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Kras	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
Lipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Map2k1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
Map2k2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
Mapk1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
Mapk10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
Mapk3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mapk8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mapk9	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
Mknk1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Mknk2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
Mtor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nras	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
Pck1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pck2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Pde3b	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pdpk1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
Phka1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Phka2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

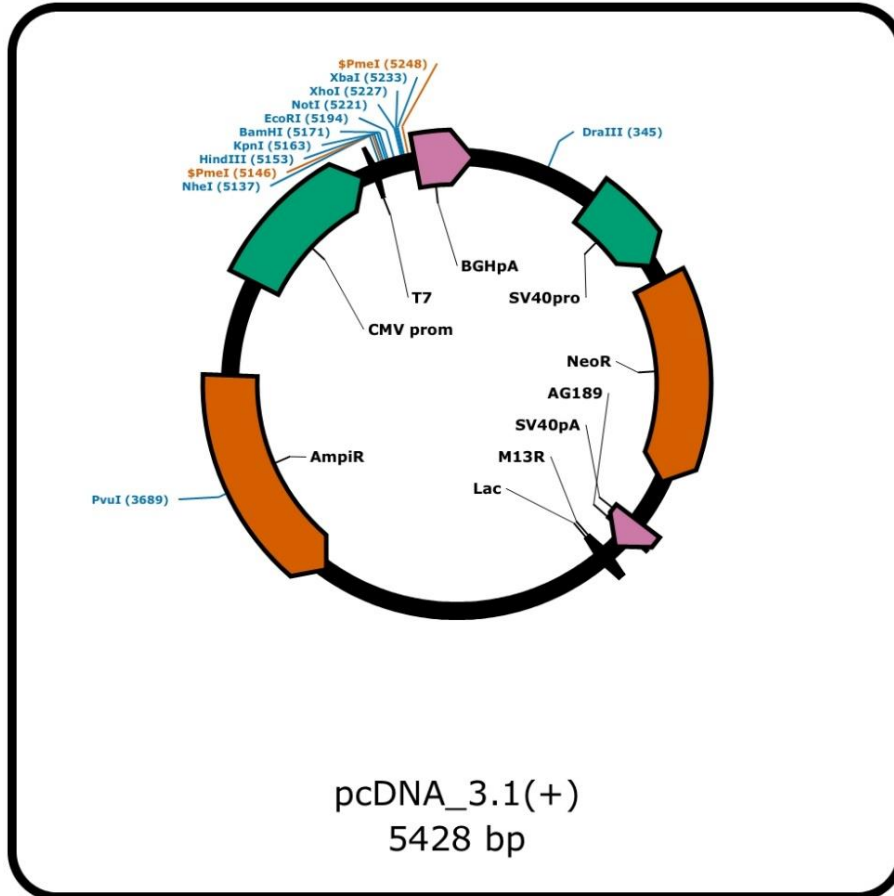
Gen	mmu-miR-100	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-409-5p	mmu-miR-501-3p	mmu-miR-674-3p	mmu-miR-99a	mmu-miR-182	mmu-miR-183	mmu-miR-1b-5p	mmu-miR-200a	mmu-miR-200b	mmu-miR-205	mmu-miR-223	mmu-miR-429	mmu-miR-146a	mmu-miR-151-3p	mmu-miR-151-5p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-423-5p	mmu-miR-485	mmu-miR-671-3p	mmu-miR-92a	mmu-miR-96
Phkb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Phkg1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phkg2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pik3ca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pik3cb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
Pik3cd	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pik3r1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
Pik3r2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pik3r3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
Pklr	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
Ppargc1a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ppp1ca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ppp1cb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Ppp1cc	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ppp1ccb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ppp1r3a	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
Ppp1r3b	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
Ppp1r3c	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0
Ppp1r3d	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
Ppp1r3e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ppp1r3f	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Prkaa1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
Prkaa2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Prkab1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Prkab2	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Prkaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
Prkacb	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1
Prkag1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
Prkag2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Prkag3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prkar1a	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
Prkar1b	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prkar2a	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
Prkar2b	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Prkci	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
Prkcz	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Ptpn1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Gen	mmu-miR-100	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-409-5p	mmu-miR-501-3p	mmu-miR-674-3p	mmu-miR-99a	mmu-miR-182	mmu-miR-183	mmu-miR-1b-5p	mmu-miR-200a	mmu-miR-200b	mmu-miR-205	mmu-miR-223	mmu-miR-429	mmu-miR-146a	mmu-miR-151-3p	mmu-miR-151-5p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-423-5p	mmu-miR-485	mmu-miR-671-3p	mmu-miR-92a	mmu-miR-96
Ptprf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Pygb	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
Pygl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pygm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Raf1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Rapgef1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Rheb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhoq	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
Rps6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Rps6kb1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Rps6kb2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sh2b2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shc1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
Shc2	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Shc3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shc4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Slc2a4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Socs1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Socs2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Socs3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Socs4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Sorbs1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
Sos1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
Sos2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Srebf1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Trip10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tsc1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
Tsc2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Blancos encontrados en la vía de señalización de insulina (KEGG mmu04910) para los microRNAs de los 3 clústeres identificados. En la tabla se representa con un 1 si el gen fue identificado en la predicción de blancos y como 0 si no es un blanco predicho.

APÉNDICE III: PLÁSMIDOS

Mapa del plásmido pcDNA3.1 vacío



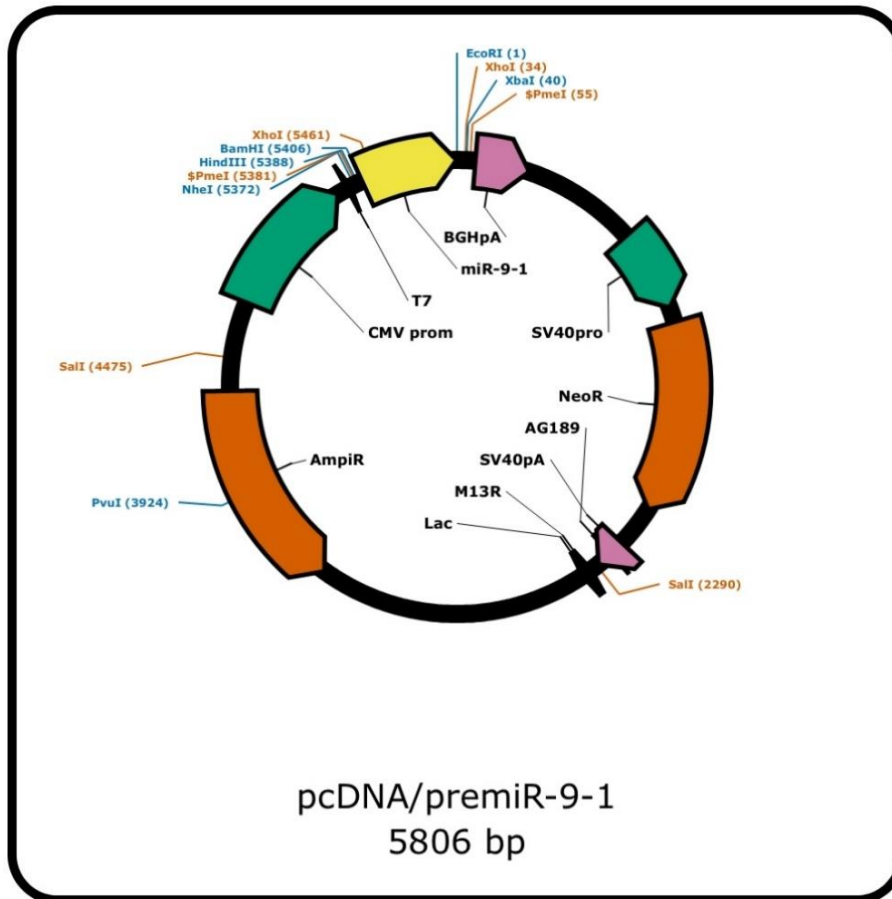
Plásmido miR-9

Plásmido pcDNA3.1 con la secuencia del premiR-9-1 de ratón (MI0000720) clonado utilizando los sitios BamHI y EcoRI.

Plásmido: pcDNA/premiR-9

Tamaño: 5806 pb

Tamaño inserto: 415 pb



Secuencia clonada con sitios de restricción

>premiR-9_RS

```
TCCTGGATCCCATCTTTTCGCCTCCACACCACGCGCGTCCCCCATCCGCCGTCGAGCGACTCGAGACTAC
GGAGGTCCAGGCGGTGGCCGGGAGGCTGCGTGGAAGAGGAGGAGGCCAGGAGGCGGGGTTGGTTGTT
ATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGGTGTGGAGTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAAGTAAAAATAA
CCCCATACTGCGCAGAGGGCCCTGGAACGCTGGTAGTGGCCGAGCTGCAGGAGGGAGAGCCGTGCCAGG
CGTGCCTGGAGGCTGGAGGGCTGGGGGGAGGGGACTCGTCGCCTTCAAAGGTTGCTCAGCCCGAGCCAC
CTCGCGATCCCCACCCGCAACCTGCTCACCTGGGAAGAAAGCAAGAAGCCGCTCTGAATTCGCCT
```

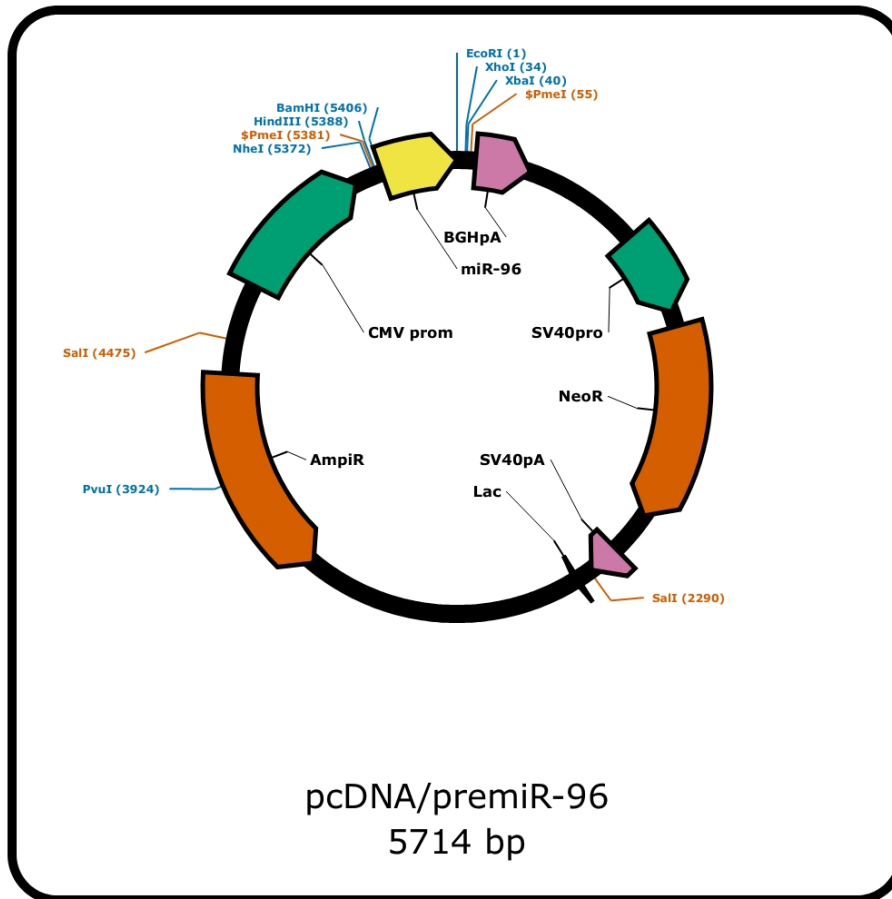
Plásmido miR-96

Plásmido pcDNA3.1 con la secuencia del premiR-96 de ratón (MI0000583) clonado utilizando los sitios BamHI y EcoRI.

Plásmido: pcDNA/premiR-96

Tamaño: 5714 pb

Tamaño inserto: 330 pb



Secuencia clonada con sitios de restricción

>pre-miR-96_RS

```
AGACGGATCCGCGAGCACCTTGGAGCTCCTCACCCCTTTCTGCCTAGACCTCTGTTCCAGGGGTGCCAG
GGTACAAAGACCTCCTCTGCTCCTTCCCCAGAGGGCCTGTCCAGTACCATCTGCTTGGCCGATTTTGGC
ACTAGCACATTTTGGCTTGTGTCTCTCCGCTGTGAGCAATCATGTGTAGTGCCAATATGGGAAAAGCGGG
CTGCTGCGGCCACGTTACCTCCCCCGGCATCCCAGGGTCTGTGTGTCTCACTGGCTCCCTGGCCCATCT
GGCTTACTGCTGGGTGAGGAGGGTACAGCCCTACCCTGGTGAATTCCCAG
```

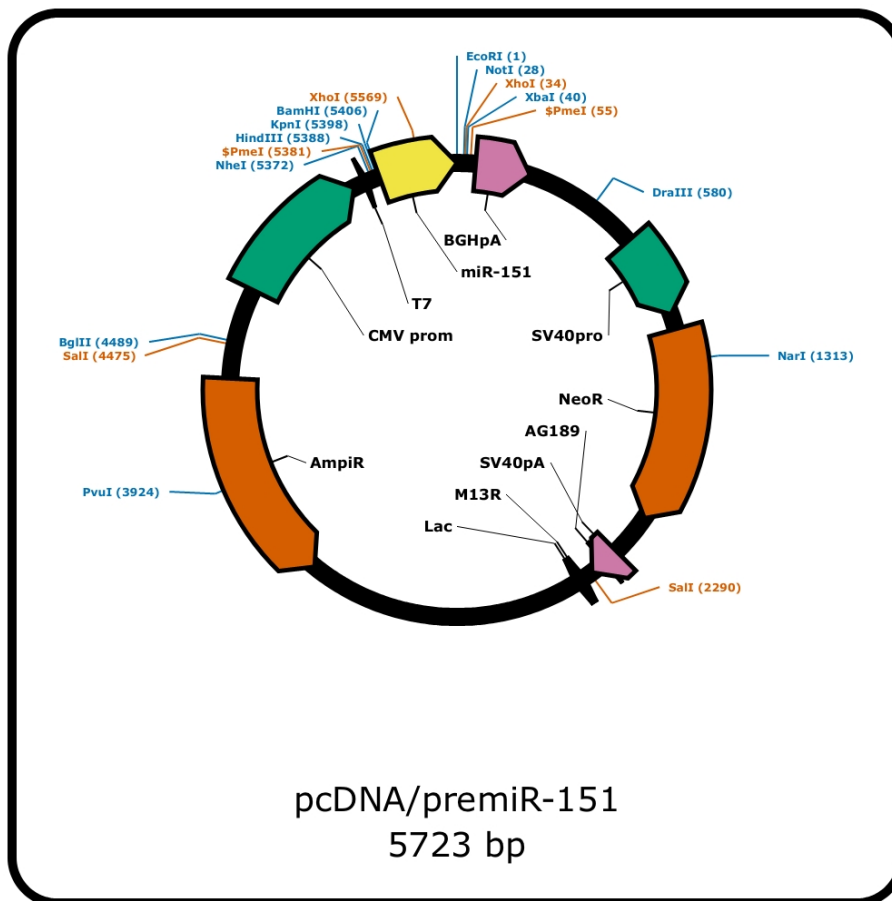
Plásmido miR-151

Plásmido pcDNA3.1 con la secuencia del premiR-151 de ratón (MI0000173) clonado utilizando los sitios BamHI y EcoRI.

Plásmido: pcDNA/premiR-151

Tamaño: 5723 pb

Tamaño inserto: 332 pb



Secuencia clonada con sitios de restricción

>amplicon_pre-miR-151_RS

```
AGCAGGATCCTCCCATTTTTCTGGCTTCTGTGTCCTGGCCCTTCTGGCTTTGCAGCCTGCCCTTCAAGT
CCTTGTAGCTCTCTTGGGTTAGGCATGCTCCAGGCAGCTGCAGCTGGACTGCTCAGGTCCTGGGCATGGA
GCACAGATGATGGAGCGCTTTTCTGCCCTCGAGGAGCTCACAGTCTAGTATGTCTCCTCCCTACTAGACT
GAGGCTCCTTGAGGACAGGGATCGTCATACTCACCTCCTGCCAGGAGCACAGTGCACATGTGCTTCTACT
GTAGCCATGACTGTCTTGTACACAGAGACTGCAGTGGAGTTGGAATTCACCA
```

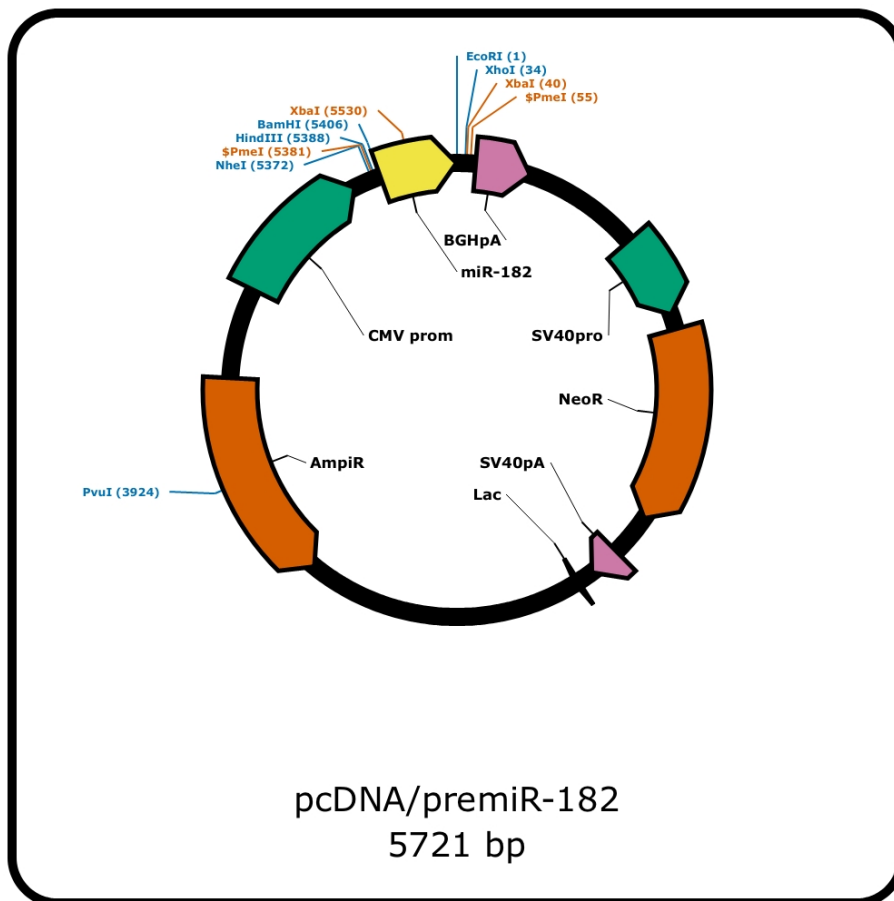
Plásmido miR-182

Plásmido pcDNA3.1 con la secuencia del premiR-182 de ratón (MI0000224) clonado utilizando los sitios BamHI y EcoRI.

Plásmido: pcDNA/premiR-142

Tamaño: 5721 pb

Tamaño inserto: 330 pb



Secuencia clonada con sitios de restricción

>pre-miR-182_RS

```
AGCGGGATCCTAAAACCACCCTAACTGCTTCTTCTTCAGCATAGGCTTACTGGTCTGGCTGCTGGAGGCC  
TCCCACCATTTTTGGCAATGGTAGAACTCACACCGGTAAGGTAATGGGACCCGGTGGTTCTAGACTTGCC  
AACTATGGTGTAAGTGCTGAGCTGCTGAAGGTCTGCACCGTGCCGGAACCTGCCGATCACCAGGAAGGAG  
AGGGGACTCCTGTCTCCAGACCACCAGGCAGTGGCAGAGGGTGGGCGCAGCTGGAAGTGACCCTTAATGT  
TTCCCTGCGCCCCCTGAGGTCACAAGTCATGAAGTCGACGAATTCTCGG
```

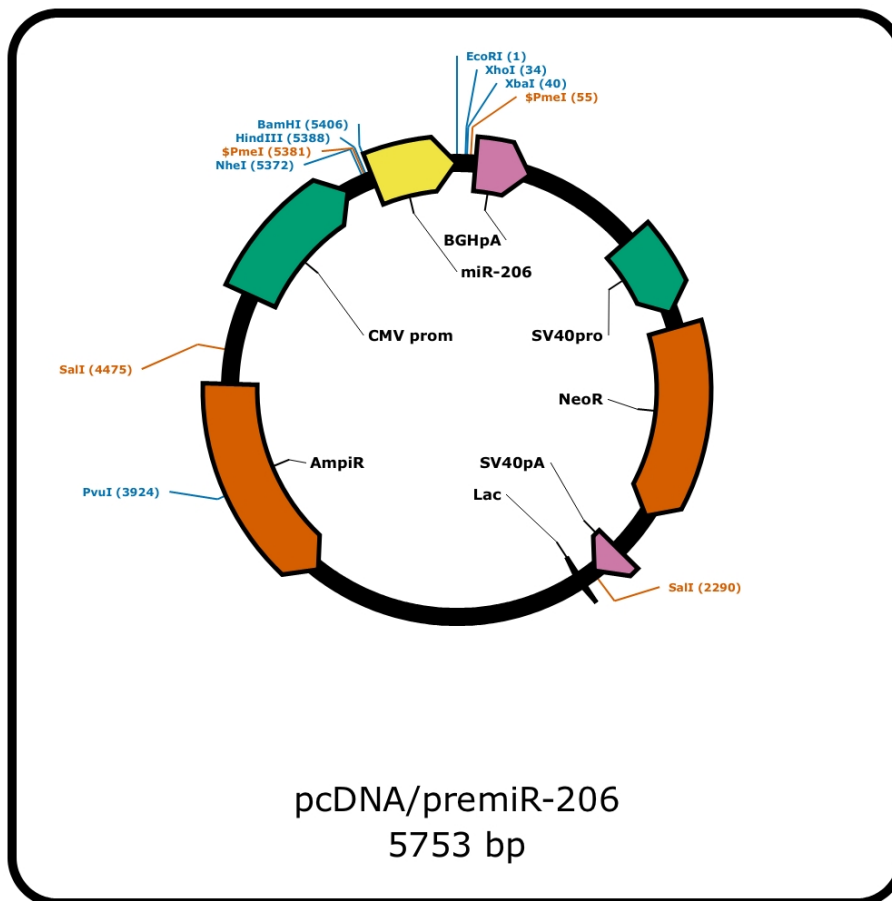
Plásmido miR-206

Plásmido pcDNA3.1 con la secuencia del premiR-206 de ratón (MI0000249) clonado utilizando los sitios BamHI y EcoRI.

Plásmido: pcDNA/premiR-206

Tamaño: 5753 pb

Tamaño inserto: 362 pb

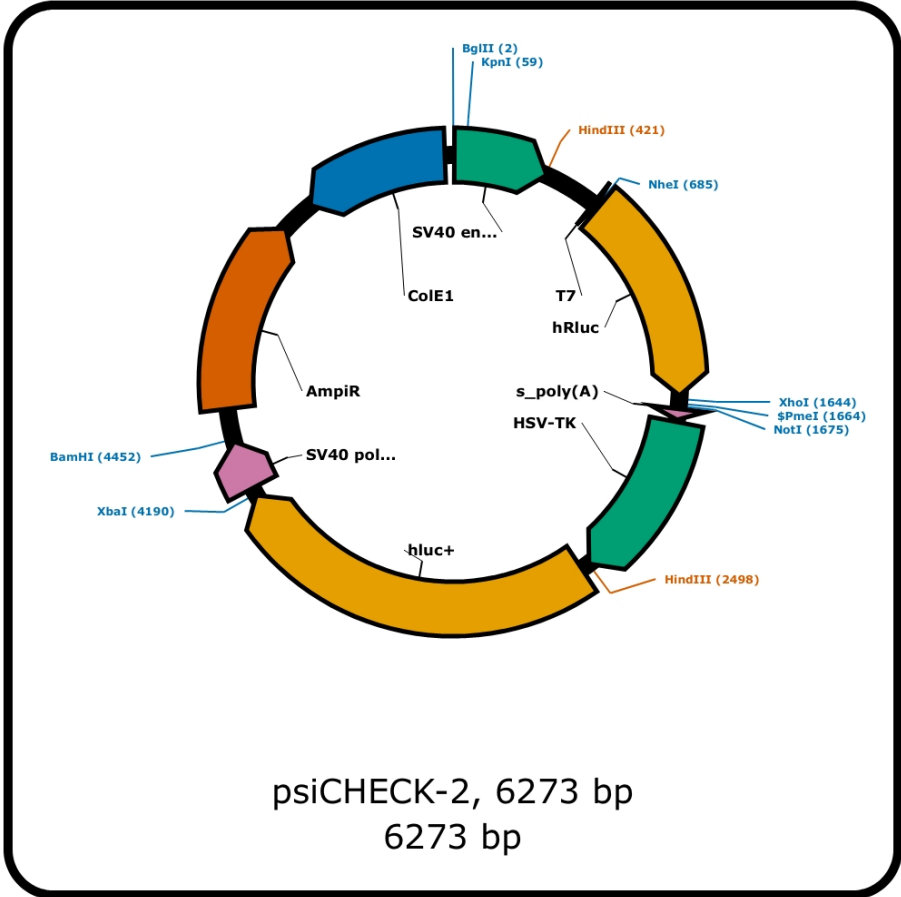


Secuencia clonada con sitios de restricción

>pre-miR-206_RS

```
AGATGGATCCTTACTCCAGGATAGTTTCTGGGAGTGTAGAATGGATGAAGTCAGGTCCCAGAGATTCTTC  
ACACTTCTCACTTGTGCAAGGAAGAAAGCAGCTTTTCCCTTCTGCGTGACAAGTGCCTCGGAGGACACAGC  
TTCCCCAGGCCACATGCTTCTTTATATCCTCATAGATATCTCAGCACTATGGAATGTAAGGAAGTGTGTG  
GTTTTGGCAAGTGCTTCTTCAAGGCCGATGGCTCCACCCAGAGAATATGCTGTTGACTTCTTCGTTCCCTT  
GGCTACATTTTCTTACCTGCAGGTGCCCTCTTCCCCAGAAATCTACCTCTACAGACTTCTCCACAATAC  
TGAATTTCAGGT
```

Mapa del plásmido psiCHECK-2 vacío



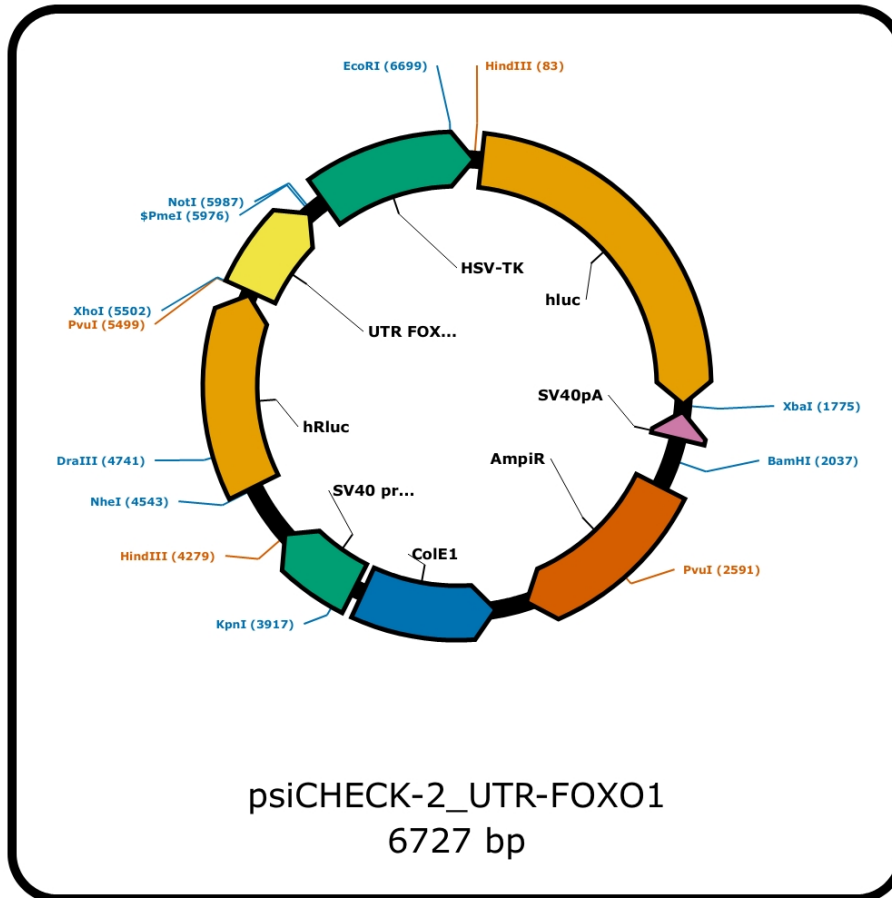
Plásmido 3UTR-Foxo1

Plásmido psiCHECK-2 con la secuencia de la 3' UTR de *Foxo1* de ratón (NM_019739.3) clonado utilizando los sitios *XhoI* y *PmeI*.

Plásmido: psiCHECK-2/UTR-FOXO1

Tamaño: 7108 pb

Tamaño inserto: 487 pb



Secuencia clonada con sitios de restricción

>3UTR_FOXO1

```
ATTGCTCGAGAGCAGGAAGTGGAGCAGTCCAAAGATGCCCTTCACCCCTCCTTATAGTTTTCAAGATT  
TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCTTTCTCCTTTCTCAGACTTGGCAACAGCGGCAGCAGCTTT  
CCTGTGCAGGATGTTTGCAGCGTCCGCAGGTTTTGTGCTCCTGTAGATAAGGACTGTGCCATTGGGAA  
TCATTACAATGAAGTGCCAAACTCACTACACCATGTAATTGCAGAAAAGACTTTCAGATCCTGGAGTGCT  
TTCAAGTTTTGTATATATGCAGTAGATACAGAATTGTATTTGTGTGTGTGTTTTTTAATACCTACTTGGT  
CCAAGGAAAGTTTATACTCTTTTGTAACTGTGATGGTCTCAAGTCTTGATAAACTTTGCTTTGTACTA  
CCTGTGTTCTGCTACAGTGAGAAGTCATGAACTAAGATCTCTGTCTGCACCTCGGTTTAAACACTG
```

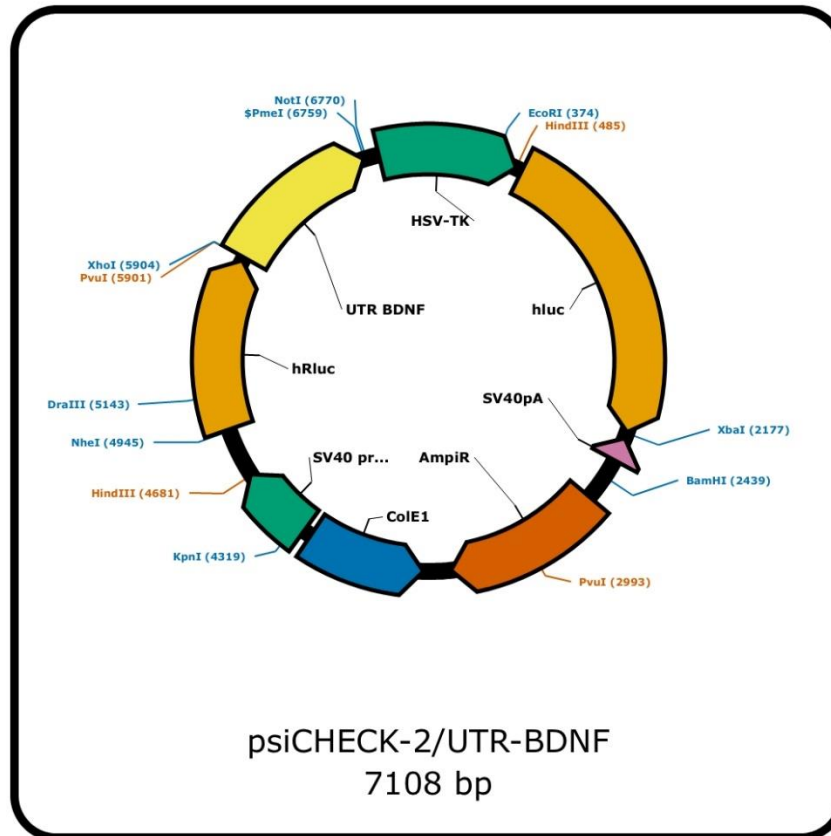

Plásmido 3UTR-BDNF

Plásmido psiCHECK-2 con la secuencia de la 3' UTR de BDNF de ratón (NM_007540) clonado utilizando los sitios XhoI y PmeI.

Plásmido: psiCHECK-2/UTR-BDNF

Tamaño: 7108 pb

Tamaño inserto: 928 pb



Secuencia clonada con sitios de restricción

>3UTR_BDNF

```
GCAACTCGAGAATTGGCTGGCGATTCATAAGGATAGACACTTCCTGTGTATGTACACTGACCATTTAAAG
GGGAAGATAGTGGATTTATGTTGTATAGATTATATTGAGACAAAATTATCTATTTGTATATATACATAAC
AGGGTAAATTTATTCAGTTAAGAAAAAATAATTTTATGAACTGCATGTATAAATGAAGTTTATACAGTACA
GTGGTTCTACAATCTATTTTATGGACATATCCATGACCTGAAAGGAAACAGTCATTTGCGCACAACTTTA
AAAGTCTGCATTACATTCCCTCGATAATGTTGTGGTTTGTGGCGTTGCCAAGAATTGAAAACAAAAGTT
TAAAAAAAATAATAATAAATTCATGCTGCTTTAATTGTGAATTGATAATAAACTGTCCCTCTTTCAGAA
AACAGATTTAAAAAACAAAAACAAAAAACAACAAAAACAAAAACAAAAATTTGGAACCAAAACAT
TCCGTTTACATTTTAGACACTAAGTATCTTCGTTCTTGTAGTACTCTGTTTTACTGCTTTCGACTTCTG
ATAGCGTTGGAATTTAAACAATGTCAAGGTGCTGTTGTCATTGCTTTACTGGCGTAAGGGACGGGGAATG
GGAGGGGTAGATTTCTGTTTGTGTTTTATTTGTTTGTGTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTTGTGTTCCACC
CGGAGTAGGGATGGAGAAAATTTCTTCACTATCCATTCTGGTTGATAAAGCGTTACATTTGTATGTTGTA
AAGATGTTTGCAAAATCCAATCAGATGACTGGAAAACAATAAAAATTAAGGCAACTGAATAAAATGCTC
ACACTCCACTGCCCATGTTTAAACTCCC
```

APÉNDICE IV: 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
- Temporizador
- Glucómetro
- Tiras reactivas (5 por ratón)
- Adaptador de plástico

Procedimiento

1. Poner a los ratones en 6 horas de ayuno antes de realizar la prueba (8:00 am)
2. Dependiendo de la prueba a realizar preparar:
 - A. Prueba de tolerancia a la glucosa: Glucosa 180 mg/ml en PBS 1x estéril, filtrar
 - 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. Marcar a los ratones con plumón indeleble para diferenciarlos y registrar el peso de cada ratón
4. Colocar a los ratones debajo de la lámpara 10 minutos antes del experimento para favorecer la vasodilatación
5. Marcar las jeringas en base al número de los ratones y cargar 10 µl de solución por gramos de peso de cada ratón (1.8 mg de glucosa o 1 mU de insulina por gramo).
6. Programar el Temporizador a 120 minutos
7. Cortar la punta de la cola del ratón con un bisturí o tijeras, ayudarse del adaptador de plástico
8. Obtener una gota de sangre y colocarla en la tira reactiva, registrar el valor de glucosa obtenido como tiempo 0 (2:00 pm, 6 horas de ayuno).
9. Realizar la inyección intraperitoneal de glucosa o insulina a los ratones e iniciar el timer después de la inyección del primer ratón.
10. Registrar los valores de glucosa en sangre en cada intervalo de tiempo (15, 30, 60 y 120 minutos).

EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO POR EL MÉTODO DE TIOCIANATO DE GUANIDINA

Modificado de: (Chomczynski y Sacchi, 1987)

Día 1

1. Homogenizar el tejido en Solución D preparada al momento
 - 1 ml de Solución D por cada 0.1 gramos de tejido
 - Agregar 7.2 μ l de β -mercaptoetanol por cada ml de Solución D
 - Enjuagar el homogenizador o sonicador con Agua tratada con DEPC autoclaveada entre muestras
 - Hacer alícuotas en tubos de 1.5 o 2 ml (usar este volumen como volumen del homogenizado)
2. Agregar 1/10 del volumen del homogenizado de Acetato de Na⁺ 2M pH4. Y dar vortex
3. Agregar un volumen de fenol saturado en agua frío. Vortex, dejar en hielo y dar vortex otra vez.
4. Agregar 0.2 vols. de cloroformo isoamilalcohol (49:1). Dar vortex hasta que la muestra se ponga lechosa.
5. Dejar reposando en hielo por 15 minutos. No volver a dar vortex.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C.
7. Sacar los tubos a temperatura ambiente. Recuperar la fase cristalina cuidando de no llevarse nada de la otra fase "cuantificándola".
8. Agregar un volumen, respecto al recuperado en el paso 7, de isopropanol. Vortex y dejar a -20°C TODA LA NOCHE.

Día 2

9. Descongelar muestras en hielo. Centrifugar a 13,500 rpm por 30 minutos a 4°C.
10. Decantar cuidadosamente y extraer el isopropanol que se deposite (con una pipeta de puntas amarillas) cuidando de no tocar el pellet.
11. Resuspender en H₂O-DEPC autoclaveada, dar vortex suave. Agregar volumen dependiendo del tamaño del pelet (15 μ l, 30 μ l o 50 μ l) (Vol resuspensión).
12. Agregar 0.1 del volumen de resuspensión de acetato de sodio 3M pH 5.3.
13. Agregar 2 volúmenes de resuspensión de etanol absoluto, dar vortex y dejar a -20°C TODA LA NOCHE.

Día 3

Nota: Poner a enfriar etanol al 70% a -20°C

14. Centrifugar a 13,500 rpm por 30 minutos a 4°C. Decantar cuidadosamente y extraer el etanol que se deposite (con pipeta puntas amarillas) cuidando de no tocar la pastilla precipitada.
15. Agregar 250 μ l de etanol al 70% (previamente enfriado a -20°C). Primero limpiar el tubo y luego mezclar suavemente hasta despegar la pastilla y centrifugar a 13,500 rpm a 4°C por 15 minutos (primer lavado). Decantar y extraer etanol con pipeta.
16. Repetir el paso 15 (segundo lavado). Asegurarse de que no queden residuos de etanol.
17. Resuspender en H₂O-DEPC recién autoclaveada, dar vortex suave.
18. Leer en el nanodrop o diluir para leer en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm. Sacar relaciones 260/230 y 260/280.

Notas:

- Si las relaciones son menores a 1.5 agregar 1/10 del volumen (con el cual se resuspendió en el punto 17) de Acetato de Sodio 3M pH 5.3 + 2 vols de etanol absoluto.
- Si se resuspendió el RNA en menos de 30µl, entonces llevar el volumen a 30µl con H₂O-DEPC.
- Vortex y dejar precipitando TODA LA NOCHE a 4°C.
- Repetir desde el paso 14.

Reactivo	Volumen por muestra	Punto
Solución D	1ml x 0.1 gr tejido = Vol Homogenizado (Vol H)	1
β-mercaptoetanol	7.2 µl x 1ml Sol D	1
Acetato de Na ⁺ (2M, pH4)	0.1 x vol H	2
Fenol	1 x vol H	3
Cloroformo isoamilalcohol	0.2 x vol H	4
Isopropanol	1 x vol recuperado	8
H ₂ O DEPC	Vol Resuspensión (Vol R)	11
Acetato de Na ⁺ (3M, pH 5.3)	0.1 x vol R	12
Etanol absoluto	2 x vol R	13
Etanol 70%	250µl x 2	15 y 16
H ₂ O DEPC	Resuspender	

APÉNDICE V: PUBLICACIONES

PUBLICACIONES PRODUCTO DEL PROYECTO DE DOCTORADO:

Díaz de León-Guerrero, S., Salazar-León, J., Meza-Sosa, K. F., Valle-Garcia, D., Aguilar-León, D., Pedraza-Alva, G. and Pérez-Martínez, L. (2022). An enriched environment re-establishes metabolic homeostasis by reducing obesity-induced inflammation. *Dis. Model. Mech.* **15**,.

PUBLICACIONES ADICIONALES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE DOCTORADO

Madrid-Paulino, E., Mata-Espinosa, D., León-Contreras, J. C., Serrano-Fujarte, I., Díaz de León-Guerrero, S., Villaseñor, T., Ramon-Luing, L., Puente, J. L., Chavez-Galan, L., Hernández-Pando, R., Pedraza-Alva, G. and Pérez-Martínez, L. (2022). Klf10 favors Mycobacterium tuberculosis survival by impairing IFN- γ production and preventing macrophages reprogramming to macropinocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **112**, 475–490.

Martínez-Armenta, M., Díaz de León-Guerrero, S., Catalán, A., Alvarez-Arellano, L., Uribe, R. M., Subramaniam, M., Charli, J.-L. and Pérez-Martínez, L. (2015). TGF β 2 regulates hypothalamic Trh expression through the TGF β inducible early gene-1 (TIEG1) during fetal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **400**, 129–39.

RESEARCH ARTICLE

An enriched environment re-establishes metabolic homeostasis by reducing obesity-induced inflammation

Sol Díaz de León-Guerrero¹, Jonathan Salazar-León¹, Karla F. Meza-Sosa¹, David Valle-García¹, Diana Aguilar-León², Gustavo Pedraza-Alva¹ and Leonor Pérez-Martínez^{1,*}

ABSTRACT

Obesity can lead to chronic inflammation in different tissues, generating insulin and leptin resistance and alterations in glucose and lipid metabolism, favoring the development of degenerative diseases, including type II diabetes. Congruently, the inflammatory signaling inhibition prevents the development of obesity and restores insulin sensitivity. Via the enhancement of central nervous system activity, an enriched environment (EE) has beneficial effects on learning and memory as well as on immune cell functions and inflammation in different disease models. Here, we explored whether an EE can restore energy balance in obese mice that previously presented metabolic alterations. We discovered that an EE improved glucose metabolism, increased insulin signaling in liver, and reduced hepatic steatosis and inflammation, and increased lipolysis and browning in the white adipose tissue of high-fat diet (HFD)-fed mice. Finally, we found reduced inflammatory signaling and increased anorexigenic signaling in the hypothalamus of HFD-fed mice exposed to an EE. These data indicate that an EE is able to restore the metabolic imbalance caused by HFD feeding. Thus, we propose EE as a novel therapeutic approach for treating obesity-related metabolic alterations.

This article has an associated First Person interview with the first author of the paper.

KEY WORDS: Obesity, Enriched environment, Inflammation, Metabolism

INTRODUCTION

Obesity has become an increasing worldwide health issue over the past years; in some countries it accounts for over 20% of the adult population (OECD, 2017). Obesity is of clinical interest as it is linked with an increased risk of developing other pathologies, such as cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer and type II diabetes (Hotamisligil, 2006). Different studies have shown that obesity is accompanied by a low-grade chronic inflammatory

state that has been described in different tissues and organs, including pancreas, skeletal muscle, adipose tissue, liver and brain (Lumeng and Saltiel, 2011). In adipose tissue, an excess in energy intake generates cellular stress, which induces the expression of cytokines and chemokines, leading to the recruitment and activation of different immune cells, mainly macrophages (Gregor and Hotamisligil, 2011). This inflammatory process impairs normal adipose tissue function by inhibiting catecholamine and insulin signaling (Reilly and Saltiel, 2017). In liver, obesity induces lipid accumulation and the activation of different inflammatory pathways that contribute to insulin resistance and a dysregulation in both glucose and lipid metabolism (Koyama and Brenner, 2017). Different studies have shown that an inflammatory process is the determining factor in impairing insulin signaling (de Luca and Olefsky, 2008). Accordingly, inhibition of the inhibitor of nuclear factor kappa (IKK)/nuclear factor κ B (NF- κ B), Jun-N-terminal kinase (JNK) and inflammasome pathways can prevent weight gain, and restore insulin sensitivity in different obesity models (Hirosumi et al., 2002; Vandanmagsar et al., 2011; Yuan et al., 2001). In this regard, anti-inflammatory therapies have been proposed to treat type II diabetes (Goldfine and Shoelson, 2017).

Recently, this inflammatory process has also been described in the brain. The hypothalamus is the brain region responsible for regulating energy balance by sensing the nutritional state of the body (Remmers and Deleamarre-van de Waal, 2011). In hypothalamus, high levels of insulin and leptin activate anorexigenic pathways, while inhibiting orexigenic signaling, to decrease food intake and increase energy expenditure (Morton et al., 2006). Both genetic and diet-induced obesity (DIO) generate an inflammatory process in hypothalamus, characterized by activated JNK and IKK/NF- κ B pathways, as well as by increased expression of inflammatory cytokines (Belgardt et al., 2010; De Souza et al., 2005; Zhang et al., 2008). This inflammatory process leads to leptin and insulin resistance, and even neuronal death, impairing the capacity of the hypothalamus to maintain homeostasis (Jais and Brüning, 2017). Nevertheless, studies have shown that the deletion of JNK1 and IKK β in neurons can rescue leptin and insulin signaling in the hypothalamus, as well as reduce weight gain and restore the metabolic alterations linked to obesity (Belgardt et al., 2010; Sabio et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Looking for therapeutic strategies that could have an effect on the brain and the inflammatory response, we decided to study an enriched environment (EE) paradigm. An EE consists of housing conditions that promote increased cognitive, sensory and motor stimuli, as well as social interaction, which lead to the activation of different brain regions (Nithianantharajah and Hannan, 2006). The effects of an EE on brain function have been widely studied and include improved learning and memory, increased long-term potentiation, induction of neurotrophin expression and increased

¹Laboratorio de Neuroinmunobiología, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, CP 62210, Mexico. ²Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición 'Salvador Zubirán', Tlalpan, Ciudad de México, CP 14000, Mexico.

*Author for correspondence (leonor@ibt.unam.mx)

 D.A.-L., 0000-0001-9667-0022; L.P., 0000-0003-4163-1653

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Handling Editor: Monica J. Justice
Received 24 January 2021; Accepted 9 December 2021

adult neurogenesis (Sampedro-Piquero and Begega, 2017). Different studies have also shown that an EE ameliorates the development of neurodegenerative disorders and decreases inflammation in the brain (Laviola et al., 2008). Exposure to an EE decreases the levels of cytokines and chemokines in the hippocampus in response to lipopolysaccharide (LPS) injection (Williamson et al., 2012). An EE has also been shown to decrease the expression of inflammatory markers in microglia and brain macrophages in a model of glucocorticoid-induced depression (Chabry et al., 2015). Housing in EE conditions also decreases brain damage generated during experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T-cell development and function (Xiao et al., 2019).

Although most of the effects of an EE have been studied in the brain, it has also been shown to have beneficial effects outside the central nervous system, where it can alter the levels of different hormones (such as corticosterone, testosterone and oxytocin) and modulate the activation and function of the immune system in different models (Bakos et al., 2009; Marashi et al., 2003). Exposure to an EE has been shown to alter the proliferation and differentiation of T cells, B cells and natural killer (NK) cells (Gurfein et al., 2017; Meng et al., 2019; Xiao et al., 2019). An EE can also prevent immune cell senescence of macrophages, lymphocytes and NK cells, improving their function in aging mice (Arranz et al., 2010). Additionally, an EE can also have anti-tumoral effects mediated by both NK and CD8T cells (Song et al., 2017; Xiao et al., 2016). In relation to obesity, previous studies have shown that an EE prevents weight gain in a model of DIO by increasing hypothalamic brain

derived neurotrophic factor (BDNF) levels, adrenergic signaling and adipose tissue browning (Cao et al., 2011).

Given this background, we sought to determine whether an EE could have beneficial effects in mice that previously presented metabolic alterations using a model of DIO. We found that housing obese mice, fed with high-fat diet (HFD), in an EE reduced fasting glucose levels and improved glucose tolerance and insulin sensitivity. EE exposure increased insulin signaling and reduced hepatic steatosis in the liver of HFD-fed mice. We also observed that an EE decreased macrophage infiltration and inflammatory mediators, but increased anti-inflammatory cytokines, lipolysis and browning markers in the adipose tissue of mice fed with HFD. Exposure to an EE also increased anorexigenic signals and decreased inflammatory proteins in the hypothalamus. These results point to a therapeutic effect of EE housing in metabolically compromised mice by alleviating inflammation in the adipose tissue and hypothalamus, thus restoring insulin signaling. Importantly, the therapeutic effect of the EE was observed even though mice were constantly fed with HFD.

RESULTS

EE housing ameliorates the metabolic alterations caused by a high-fat diet and improves insulin sensitivity

C57BL/6N mice were housed in standard housing conditions and fed for 13 weeks with either a normal diet (ND), as a control group, or with HFD to generate DIO. As expected, mice fed with HFD had increased weight from week 3 to week 13 compared to those fed with ND (Fig. 1A,B), which correlated with a higher caloric intake

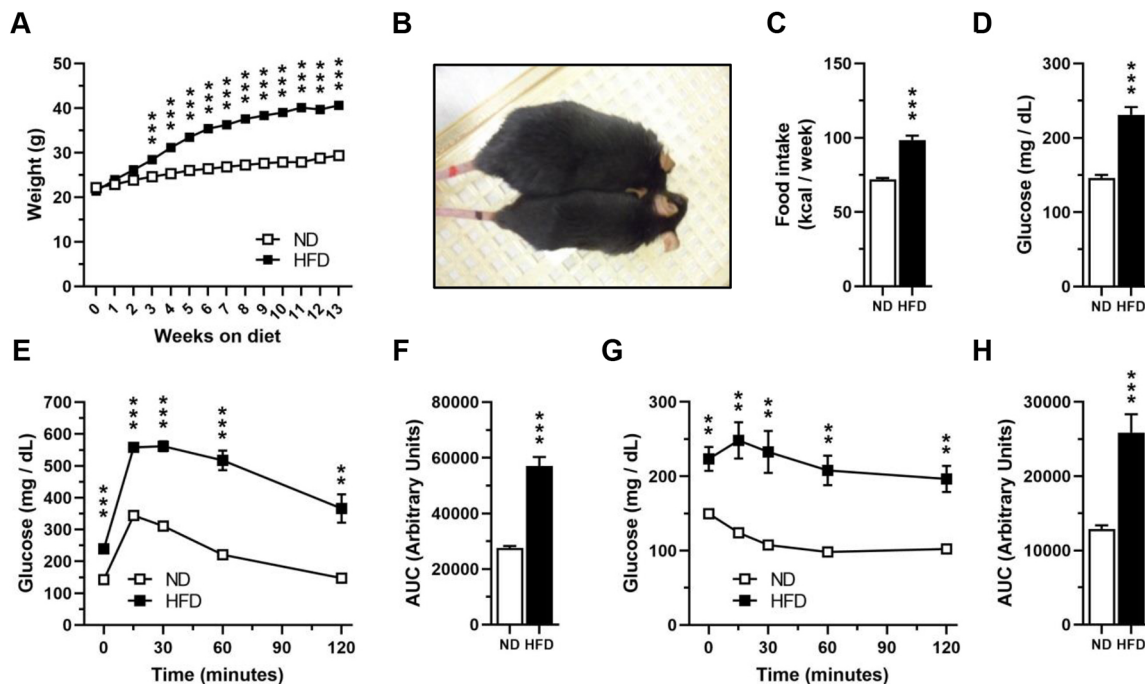


Fig. 1. High-fat diet feeding induces obesity and metabolic alterations in mice. C57BL/6N mice were divided to be fed with either ND or HFD for 13 weeks in control housing conditions. (A) Average weekly weight of mice fed with ND or HFD (ND, $n=30$; HFD, $n=44$). Two-way ANOVA revealed a significant effect for interaction $F(13, 936)=124.6$, $P<0.0001$; time on diet $F(13, 936)=499.9$, $P<0.0001$; diet $F(1, 72)=81.13$, $P<0.0001$; and subject $F(72, 936)=65.40$, $P<0.0001$. (B) Representative photo of a mouse fed with ND (bottom) or HFD (top) after 13 weeks. (C) Average weekly food intake of mice fed with ND or HFD ($n=13$ weeks). Mice were fasted for 6 h to measure blood glucose levels and to perform a GTT or ITT to corroborate the effects of HFD feeding on glucose metabolism after 11 weeks of being fed with ND or HFD. (D) Fasting blood glucose levels at week 11 ($n=20$). (E) GTT after 11 weeks ($n=10$). Two-way ANOVA revealed a significant effect for interaction $F(4, 72)=13.91$, $P<0.0001$; time $F(1.864, 33.54)=130.3$, $P<0.0001$; diet $F(1, 18)=98.57$, $P<0.0001$; and subject $F(18, 72)=5.931$, $P<0.0001$. (F) AUC for the GTT ($n=10$). (G) ITT after 11 weeks ($n=10$). Two-way ANOVA revealed a significant effect for interaction $F(4, 72)=7.337$, $P<0.0001$; time $F(2.265, 40.77)=19.33$, $P<0.0001$; diet $F(1, 18)=25.23$, $P<0.0001$; and subject $F(18, 72)=33.97$, $P<0.0001$. (H) AUC for the ITT ($n=10$). Data are mean \pm s.e.m. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ versus ND [two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test (A,E,G) or unpaired t -test (C,D,F,H)].

(72±3.446 kcal/week ND group versus 98.51±10.61 kcal/week HFD group; mean±s.d.) per week (Fig. 1C). Additionally, HFD-fed mice had higher fasting glucose levels (146.2±18.25 mg/dl ND group versus 231.1±46.03 mg/dl HFD group) (Fig. 1D) and exhibited glucose intolerance (Fig. 1E,F) and insulin resistance (Fig. 1G,H), which is consistent with previous reports (Collins et al., 2004; Luo et al., 1998).

To determine whether an EE is capable of ameliorating the metabolic alterations observed in these obese mice, we divided the mice so that they were kept either in standard housing conditions (ND control and HFD control groups) or in an EE (ND enriched and HFD enriched groups) (Fig. 2A). Mice were maintained on the same

diet they had been given before the switch in housing conditions for an additional 3 months to evaluate weight gain, food intake and to perform metabolic tests. To elucidate whether the EE modulates the metabolic alterations in a time-dependent manner, we included a HFD group exposed to the EE for only 5 weeks before euthanasia, making two HFD enriched groups: HFD enriched 1 M and HFD enriched 3 M (Fig. 2A)

Mice fed with ND and maintained either in control housing conditions (ND control) or in EE (ND enriched) presented very similar weight throughout the experiment (final weight, 33.06±4.493 g ND control versus 28.89±2.775 g ND enriched; mean±s.d.) (Fig. 2B,C), which correlated with similar energy intake

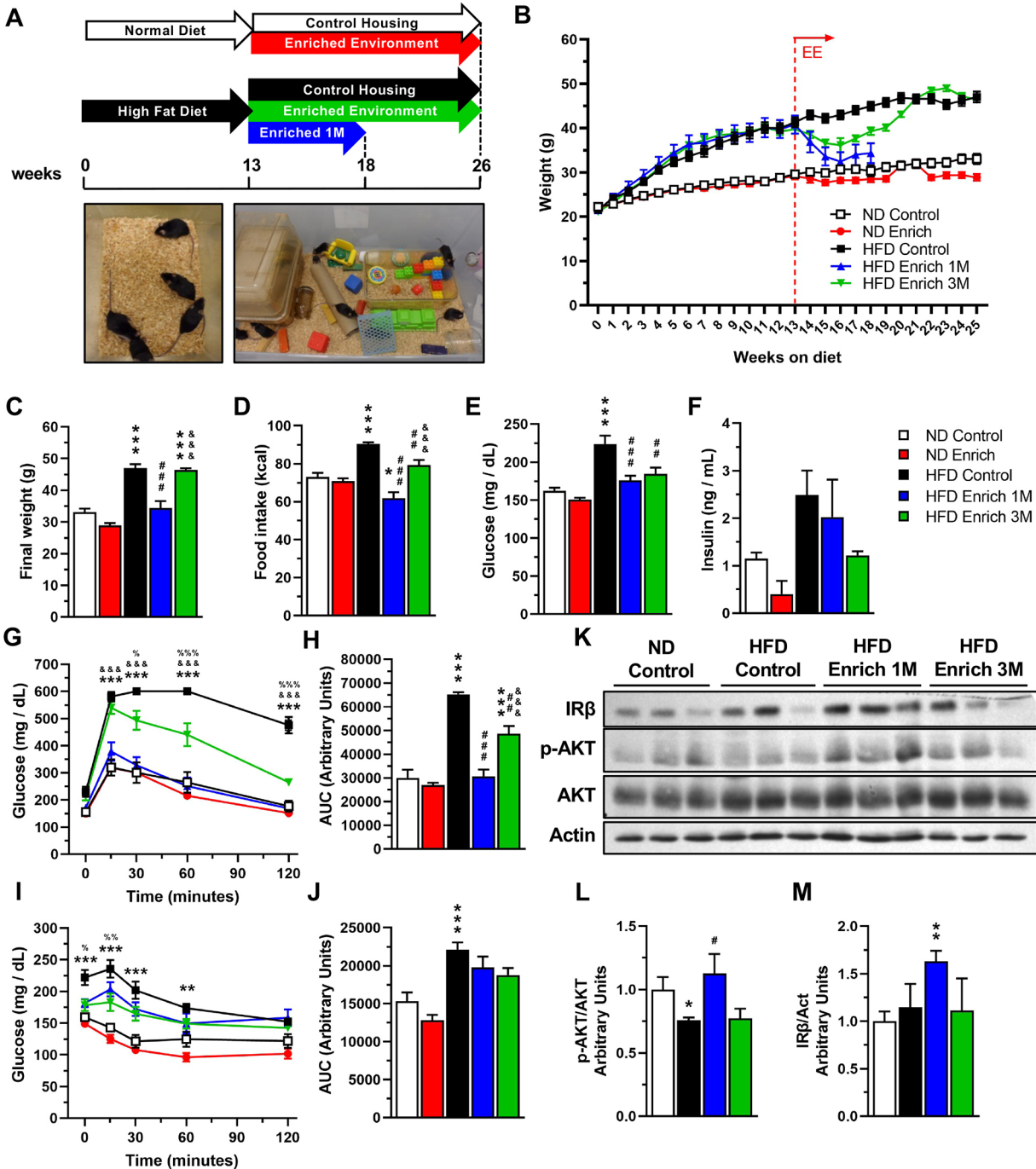


Fig. 2. See next page for legend.

Fig. 2. An EE ameliorates the metabolic effects caused by a high-fat diet and improves insulin signaling in the liver. C57BL/6N mice in control housing conditions were fed with ND or HFD for 13 weeks and were then separated into control housing or EE for an additional 5 or 13 weeks. Mice were fed with the same diet they had before they were separated into different housing conditions. Five experimental groups were formed: ND control housing (ND control); normal diet EE (ND enriched); HFD control housing (HFD control); and two HFD EE (HFD enriched) groups. Two different timepoints were used for the HFD enriched groups: HFD enriched 1 M was maintained for an additional 5 weeks, and HFD enriched 3 M was maintained for 12 weeks after the change in housing conditions together with the other control groups. (A) Experimental design. The dotted lines represent when the mice were euthanized: at 18 (for the HFD enriched 1 M) or 26 weeks (for the ND control, ND enriched, HFD control and HFD enriched 3 M groups). Representative photo of a control housing cage (left) and an EE cage (right) (not to scale). (B) Average weekly weight throughout the experiment. The dotted vertical line shows when the mice were separated into the different housing conditions at week 13 (ND control, $n=15$; ND enriched, $n=14$, HFD control, $n=15$; HFD enriched 1 M, $n=14$; HFD enriched 3 M, $n=15$). (C) Final weight at week 18 for the HFD enriched 1 M group ($n=14$), or at week 25 for the ND control ($n=15$), ND enriched ($n=14$), HFD control ($n=15$) and HFD enriched 3 M groups ($n=15$). One-way ANOVA revealed a significant difference between group means $F(4, 68)=40.45$, $P<0.0001$. (D) Weekly average of food intake after the mice were separated into different housing conditions (ND control, ND enriched, HFD control and HFD enriched 3 M, $n=12$ weeks; HFD enriched 1 M, $n=5$ weeks). One-way ANOVA revealed a significant difference between group means $F(4, 44)=22.44$, $P<0.0001$. Mice were fasted for 6 h to measure blood glucose levels and to perform a GTT or ITT to determine the effects of the housing conditions on glucose metabolism. The measurements were recorded at week 17 for the HFD enriched 1 M group or at week 25 for the ND control, ND enriched, HFD control and HFD enriched 3 M groups. (E) Fasting blood glucose levels ($n=10$). One-way ANOVA revealed a significant difference between group means $F(4, 45)=15.28$, $P<0.0001$. (F) Fasting serum insulin levels after 18 (HFD enriched 1 M) or 26 (ND control, ND enriched, HFD control and HFD enriched 3 M) experimental weeks ($n=3$). One-way ANOVA did not reveal a significant difference between group means $F(4, 10)=3.358$, $P=0.0547$. (G) GTT ($n=5$). Two-way ANOVA revealed a significant effect for interaction $F(16, 80)=11.79$, $P<0.0001$; time $F(4, 80)=219.1$, $P<0.0001$; group $F(4, 20)=40.19$, $P<0.0001$; and subject $F(20, 80)=6.836$, $P<0.0001$. (H) AUC for the GTT. One-way ANOVA revealed a significant difference between group means $F(4, 20)=41.07$, $P<0.0001$. (I) ITT (ND control, $n=10$; ND enriched, $n=10$; HFD control, $n=9$; HFD enriched 1 M, $n=5$; HFD enriched 3 M, $n=7$). Two-way ANOVA revealed a significant effect for time \times group $F(16, 144)=4.511$, $P<0.0001$; time $F(4, 144)=63.93$, $P<0.0001$; group $F(4, 36)=17.64$, $P<0.0001$; and subject $F(36, 144)=10.44$, $P<0.0001$. (J) AUC for the ITT. One-way ANOVA revealed a significant difference between group means $F(4, 36)=14.49$, $P<0.0001$. (K) Representative western blot of proteins of the insulin signaling pathway in liver. (L,M) Densitometric analysis of protein levels of phosphorylated AKT Ser473 (p-AKT) (L), and insulin receptor β subunit (IR β) (M) ($n=6$). Data are mean \pm s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, versus ND control; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, versus HFD control; &&& $P<0.001$, versus HFD enriched 1 M; and % $P<0.05$, %% $P<0.01$, %%% $P<0.001$, versus HFD enriched 3 M [two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test (G,I); one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test (C-F,H,J); or unpaired t -test (L,M)]. Statistical significance against the ND enriched group is not shown on the graphs for clarity. For G and I, only comparisons against the HFD control group are shown in the graph.

between both groups (72.93 ± 7.414 kcal/week ND control versus 70.72 ± 5.054 kcal/week ND enriched) (Fig. 2D). We also observed no differences in the levels of fasting glucose (162.1 ± 13.32 mg/dl ND control versus 150.5 ± 8.6 mg/dl ND enriched) (Fig. 2E) and serum insulin levels (1.149 ± 0.2166 ng/ml ND control versus 0.4039 ± 0.4755 ng/ml ND enriched) (Fig. 2F) when comparing both ND-fed groups. Accordingly, we observed that mice fed with ND had normal glucose tolerance (Fig. 2G,H) and insulin sensitivity (Fig. 2I,J), showing no difference between both housing conditions at the end of the experiment. However, comparing the data of only the ND-fed mice before the change in housing

conditions (ND) with the results collected at the end of the experiment (ND control and ND enriched), we found that ND control mice gained weight (Fig. S1A, left panel) without any change in food intake (Fig. S1B, left panel) and had a small increase in fasting glucose levels (Fig. S1C, left panel), but showed similar glucose tolerance (Fig. S1D) and a diminished insulin response with aging (Fig. S1G), which was not observed in the ND enriched group. These results suggest that EE maintains metabolic homeostasis, even in ND-fed mice.

On the other hand, the HFD control group gained weight over the entire experiment (Fig. 2B). Mice that were fed with HFD and then switched to EE had an initial weight loss in both groups (HFD enriched 1 M and HFD enriched 3 M) (Fig. 2B), but surprisingly, the HFD enriched 3 M group reached the same weight as the HFD control group after 25 experimental weeks (47.03 ± 4.727 g HFD control versus 46.38 ± 2.25 g HFD enriched 3 M) (Fig. 2C), even though they had a lower weekly energy intake (79.24 ± 8.85 kcal HFD enriched 3 M versus 90.38 ± 2.71 kcal HFD control) (Fig. 2D). HFD enriched 1 M group had a lower final weight compared to both the HFD enriched 3 M and the HFD control groups (35.35 ± 8.37 g HFD enriched 1 M) at week 18 (Fig. 2C), which correlated with lower caloric intake (61.88 ± 6.88 kcal HFD enriched 1 M) (Fig. 2D).

Even though both the HFD control and HFD enriched 3 M groups exhibited the same weight at the end of the experiment, we identified differences in several metabolic parameters between these groups. We observed that both HFD enriched groups had lower fasting glucose levels compared to the HFD control group (226.3 ± 36.51 mg/dl HFD control versus 176.1 ± 18.86 mg/dl HFD enriched 1 M, and 181.7 ± 29.34 mg/dl HFD enriched 3 M) (Fig. 2E). Still, there was no difference in serum insulin levels with respect to HFD control group (2.488 ± 0.8924 ng/ml HFD control versus 1.217 ± 0.1501 ng/ml HFD enriched 3 M), although insulin levels in the HFD enriched 3 M mice were similar to those observed in the ND control group (Fig. 2F). Accordingly, both HFD enriched groups had improved glucose tolerance compared to the HFD control group, with the HFD enriched 1 M group and the ND groups having a similar response in the glucose tolerance test (GTT; Fig. 2G,H). In the insulin resistance test, we found lower glucose levels in HFD enriched 3 M group compared to HFD control group (Fig. 2I). This decrement was particularly evident at the first two timepoints (T=0 and 15 min) after the insulin injection compared to the HFD control group, suggesting that mice housed in an EE for 3 months had increased insulin sensitivity (Fig. 2I). Comparing the data obtained from the HFD-fed mice before the change in housing conditions (HFD) and at the end of the experiment (HFD control, HFD enriched 1 M and HFD enriched 3 M), we observed that both HFD control and HFD enriched 3 M mice gained weight compared to HFD-fed mice at 13 weeks, whereas HFD enriched 1 M mice lost weight (Fig. S1A, right panel). Additionally, both EE groups (HFD enriched 1 M and HFD enriched 3 M) showed decreased food intake and fasting glucose levels (Fig. S1B,C, right panels), whereas the HFD enriched 1 M group had improved glucose tolerance (Fig. S1E,F, right panel) and the HFD enriched 3 M group presented higher insulin sensitivity (Fig. S1H,I, right panel) compared to the HFD-fed mice before the change in housing conditions. These data indicate that our EE conditions restore the metabolic alterations in metabolically compromised mice fed with a HFD.

To further determine the effects of EE housing on insulin sensitivity, we analyzed the activation of the insulin signaling pathway in the liver (Fig. 2K). Previous studies have shown that HFD feeding inhibits insulin signaling in different tissues by

reducing AKT phosphorylation (p-AKT) (Sabio et al., 2008), an important component of the insulin signaling pathway. As expected, we observed that the administration of HFD reduced p-AKT levels in the liver compared to the ND control group (Fig. 2L). Importantly, we found that exposure to an EE increased the levels of p-AKT in the liver after 1 month in the EE (HFD enriched 1 M), but this increase was lost after a 3-month exposure to the EE (HFD enriched 3 M) (Fig. 2L). Interestingly, increased p-AKT levels correlated with higher levels of the beta subunit of the insulin receptor (IR β) in the HFD enriched 1 M group (Fig. 2M). Together, these data indicate that an EE is capable of re-establishing insulin signaling in the liver and improving glucose metabolism in obese mice.

An EE reduces the inflammatory process in the adipose tissue of obese mice

An excess in energy intake generates cellular stress in the adipose tissue, which is accompanied by the secretion of chemokines and cytokines that lead to the recruitment and activation of immune cells

and to the development of a low-grade chronic inflammatory state in this tissue (Reilly and Saltiel, 2017). To assess whether the effect of an EE on the damage caused by DIO was associated with a reduction in the inflammatory process, we performed histological analyses of epididymal white adipose tissue (WAT) (Fig. 3A). As previously reported (Strissel et al., 2007), we observed increased cell infiltration into WAT of HFD control group compared to ND-fed mice (Fig. 3A-C). Interestingly, the area and number of infiltrated cells into WAT were decreased in both the HFD enriched 1 M and the HFD enriched 3 M groups compared to the HFD control group (Fig. 3A-C). Given that macrophage infiltration into WAT has been reported to commonly occur during obesity (Weisberg et al., 2003), we determined the identity of the infiltrated cells by immunohistochemistry assays using the CD68 and CD163 macrophage markers (Barros et al., 2013; Fig. 3A). We observed that HFD induces the recruitment of CD68⁺ and CD163⁺ macrophages to WAT compared to the ND control group (Fig. 3D,E). Interestingly, exposure to the EE significantly reduced the number of CD163⁺ macrophages and slightly diminished the

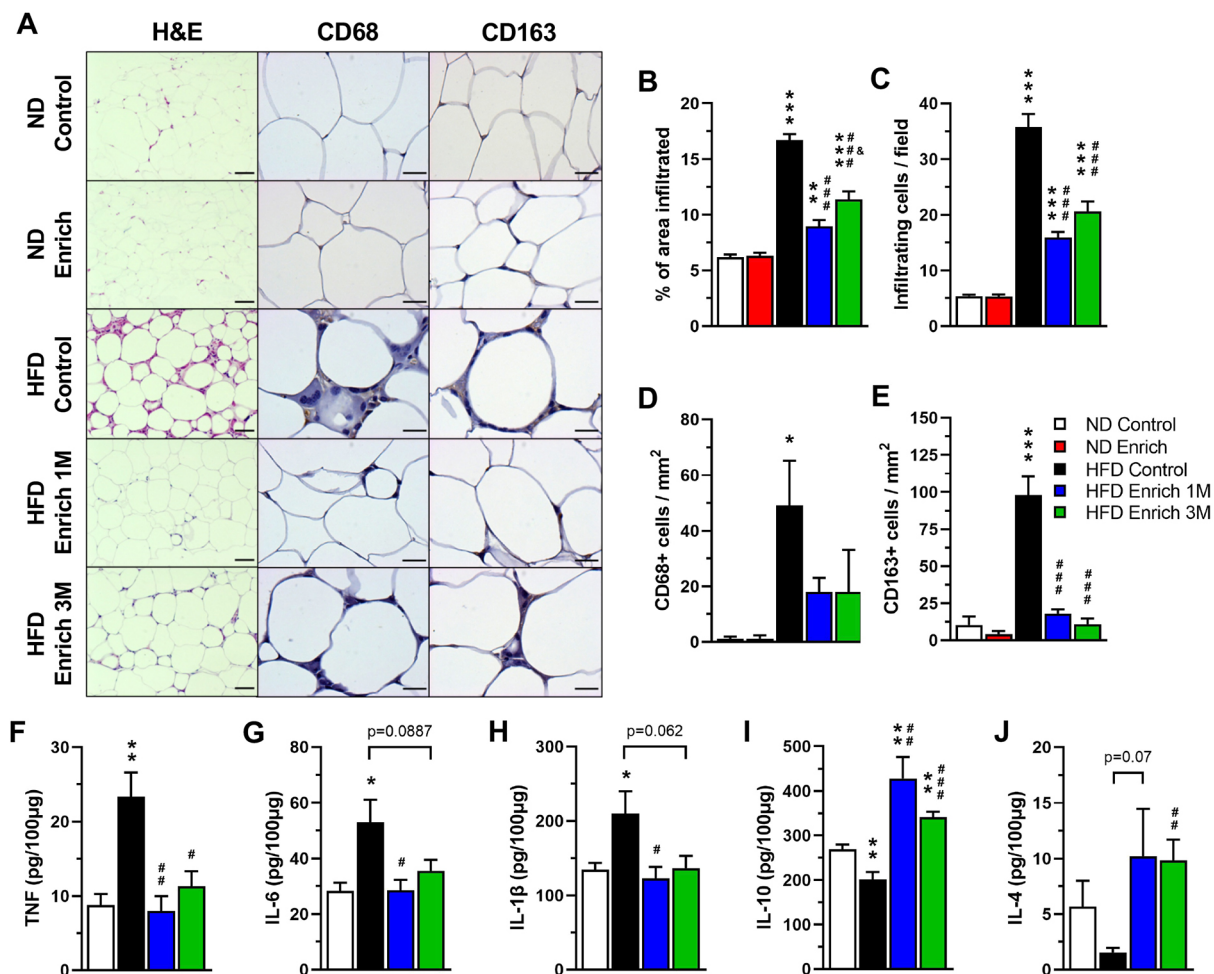


Fig. 3. An EE reduces cell infiltration and inflammation in the adipose tissue. (A) Representative photos of H&E staining and immunohistochemistry for macrophage markers CD68 and CD163 in epididymal WAT. Scale bars: 200 μ m for H&E; 50 μ m for CD68 and CD163. (B,C) Percentage of infiltrated area (B) and infiltrating cell count (C) in WAT determined by H&E staining ($n=5$). One-way ANOVA revealed a significant difference between group means for the infiltrated area [$F(4, 235)=66.99, P<0.0001$] and number of infiltrating cells [$F(4, 235)=76.38, P<0.0001$]. (D,E) Number of infiltrating CD68⁺ cells (D) and CD163⁺ cells (E) determined by immunohistochemistry in WAT ($n=5$). One-way ANOVA did not reveal a significant difference between group means for the number of CD68⁺ cells [$F(4, 20)=3.694, P=0.0208$], but did reveal a significant difference for the number of CD163⁺ cells [$F(4, 20)=34.46, P<0.0001$]. (F-J) WAT protein levels of TNF (F), IL-6 (G), IL-1 β (H), IL-10 (I) and IL-4 (J) determined by ELISA ($n=5$). Data are mean \pm s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, versus ND control; # $P<0.05$, ### $P<0.01$, #### $P<0.001$, versus HFD control; and & $P<0.05$, versus HFD enriched 1 M [one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test (B-E) or unpaired t -test (F-J)]. Statistical significance against ND enriched is not shown on the graphs for clarity.

number of CD68⁺ macrophages in both HFD enriched groups (Fig. 3D,E). These data indicate that EE reduces immune cell infiltration and suggest reduced inflammation in the WAT.

To gain more insight into the inflammatory process in WAT, we determined the secretion profile of different cytokines and chemokines using an antibody array (Fig. S2, Table S1). We observed that the levels of several proteins (leptin, TNF, TNFRI, TNFRII, FASL, IL-2, IL-9, IL-12 p70, CCL2, CCL3, CCL9, CCL11, CCL24, CXCL1, CX3CL1, G-CSF, M-CSF, and CD30L) were increased at least 2-fold in the HFD control group against the ND control group (Table S1). Strikingly, we found that many of these inflammatory markers were reduced in the WAT of both HFD enriched 1 M and HFD enriched 3 M mice compared to that of the HFD control mice (e.g. leptin, CCL2, CCL9, CCL11, CCL24, IL-2, IL-6, IL-12 p70, TNF, FASL, G-CSF and M-CSF, among others) (Fig. S2, Table S1). These data were further corroborated in epididymal WAT by ELISA assays. We found increased protein levels of the proinflammatory cytokines TNF (Fig. 3F), IL-6 (Fig. 3G) and IL-1 β (Fig. 3H) in the WAT of HFD control mice compared to ND-fed mice. Importantly, the EE restored the levels of these inflammatory cytokines to those observed in the WAT of the animals fed with ND (Fig. 3F-H). TNF levels were significantly reduced in both EE groups compared to HFD control mice (Fig. 3F), and IL-6 and IL-1 β were reduced in the WAT of HFD enriched 1 M mice compared to HFD control mice (Fig. 3G,H). We also found reduced levels of the anti-inflammatory cytokines IL-10 (compared to the ND control group, Fig. 3I) and IL-4 (Fig. 3J) in epididymal WAT of HFD control mice. Interestingly, IL-10 was increased in both EE groups compared to ND control and HFD control mice (Fig. 3I); in contrast, IL-4 was significantly increased in the WAT of HFD enriched 3 M mice compared to HFD control mice (Fig. 3J). Together, these results demonstrate that the EE reduces the inflammatory process in adipose tissue of HFD-fed mice favoring an anti-inflammatory status.

An EE reduces hepatic steatosis, promotes lipolysis in the adipose tissue and induces hypothalamic anorexigenic signals

HFD feeding has been shown to promote lipid accumulation in the liver, leading to non-alcoholic hepatic steatosis (Koyama and Brenner, 2017). We found that EE housing for 3 months visibly diminished liver steatosis resulting from HFD feeding compared to HFD control mice (Fig. 4A).

WAT serves as the primary depot for lipids in the body. The hormone-sensitive lipase (HSL) is the rate-limiting enzyme in the hydrolysis of adipose-tissue-stored triglycerides (Jocken and Blaak, 2008). In response to catecholamines, HSL is phosphorylated and activated via a PKA-dependent mechanism, allowing its translocation to lipid droplets (Frühbeck et al., 2014). To further support the idea that exposure to EE improves lipid metabolism, we determined the levels of HSL phosphorylation in the WAT (Fig. 4B). We found that total HSL was reduced in the WAT of HFD enriched 1 M and 3 M mice compared to ND-fed mice (Fig. 4C). When examining HSL activation, we found that the levels of phosphorylated HSL at Ser⁶⁶⁰ in WAT were decreased in response to HFD feeding (Fig. 4D), as reported previously (Gaidhu et al., 2010). Even though total HSL was reduced in HFD enriched mice, the levels of phosphorylated HSL at Ser⁶⁶⁰ were maintained in the WAT of mice in the HFD enriched 1 M and 3 M groups compared to ND control group (Fig. 4D). These data suggest that an EE decreases lipid accumulation in the liver while maintaining fatty acid lipolysis in adipose tissue of HFD-fed mice, which may contribute to an improved metabolic state.

WAT browning has well-known benefits for whole-body energy balance, increasing energy expenditure and decreasing weight gain (Boström et al., 2012; Seale et al., 2011). Therefore, we determined whether EE housing is able to induce this process in obese mice that present metabolic alterations by measuring the expression level of different browning markers in WAT (Barneda et al., 2015; Maurer et al., 2015; Pettersen et al., 2019; Seale et al., 2011). Interestingly, exposure to an EE increased the expression of cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha subunit-like effector A (*Cidea*), uncoupling protein 1 (*Ucp1*) and cytochrome c oxidase subunit 7A1 (*Cox7a1*) in a time-dependent manner (Fig. 4E-G). *Cidea* and *Ucp1* mRNA levels were increased after a 1-month exposure to the EE by 3.39-fold and 2.89-fold, respectively, compared to the HFD control group (Fig. 4E,F), and similar levels were maintained after 3 months in EE housing. In addition to this, 3-month exposure to an EE increased *Cox7a1* mRNA levels by 2.08-fold compared to HFD control group (Fig. 4G). Also, both HFD enriched groups presented significantly increased mRNA levels of *Ucp1*, *Cidea* and *Cox7a1* compared to ND control mice (Fig. 4E-G), whereas PR/SET domain 16 (*Prdm16*) was only significantly increased in the HFD enriched 3 M group (Fig. 4H). These results indicate that an EE induces WAT browning even in mice with obesity, which could reduce the metabolic alterations associated with HFD feeding.

An EE has been shown to promote WAT browning and to increase energy expenditure by inducing the expression of hypothalamic BDNF (Cao et al., 2011). BDNF plays an important role in energy homeostasis by having anorexigenic effects in the hypothalamus (Godar et al., 2011; Rosas-Vargas et al., 2011). Given the effects we observed in the upregulation of WAT browning markers, we examined whether under our experimental conditions the EE was also regulating BDNF signaling in the hypothalamus (Fig. 4I). Interestingly, we found increased mature BDNF protein levels in the hypothalamus of mice in the HFD enriched 1 M group (Fig. 4J). However, the unprocessed BDNF precursor (proBDNF) was reduced in all HFD-fed groups compared to ND control group (Fig. 4K). Furthermore, we observed increased protein levels of the BDNF receptor tropomyosin receptor kinase B (TRKB, also known as NTRK2) in the HFD enriched 3 M group (Fig. 4L). These results suggest that EE could enhance BDNF-TRKB signaling in the hypothalamus of HFD-fed mice.

In addition to the increased levels of hypothalamic BDNF in response to the EE, proopiomelanocortin (*Pomc*) transcript levels were significantly upregulated in the hypothalamus of the HFD enriched 1 M mice and showed a slight increase in mice exposed to the EE for 3 months (Fig. 4M). Moreover, levels of cocaine and amphetamine regulated transcript (*Cart*, also known as *Cartpt*) were also upregulated by a 3-month exposure to EE in the hypothalamus (Fig. 4N). The upregulation of BDNF, *Pomc* and *Cart* suggest increased anorexigenic signaling, which correlates with the decrease in food intake observed in both HFD enriched groups (Fig. 2D).

So far, these data indicate that an EE is able to revert the metabolic alterations caused by a HFD intake by increasing lipolysis and thermogenic gene expression in WAT, decreasing liver steatosis, and by activating hypothalamic anorexigenic signaling; processes that might lead to the improvement in glucose metabolism observed in our obese mice.

An EE reduces inflammatory signaling in the hypothalamus of obese mice

In the brain, the hypothalamus senses energy levels to regulate food intake and energy expenditure, maintaining energy balance (Morton

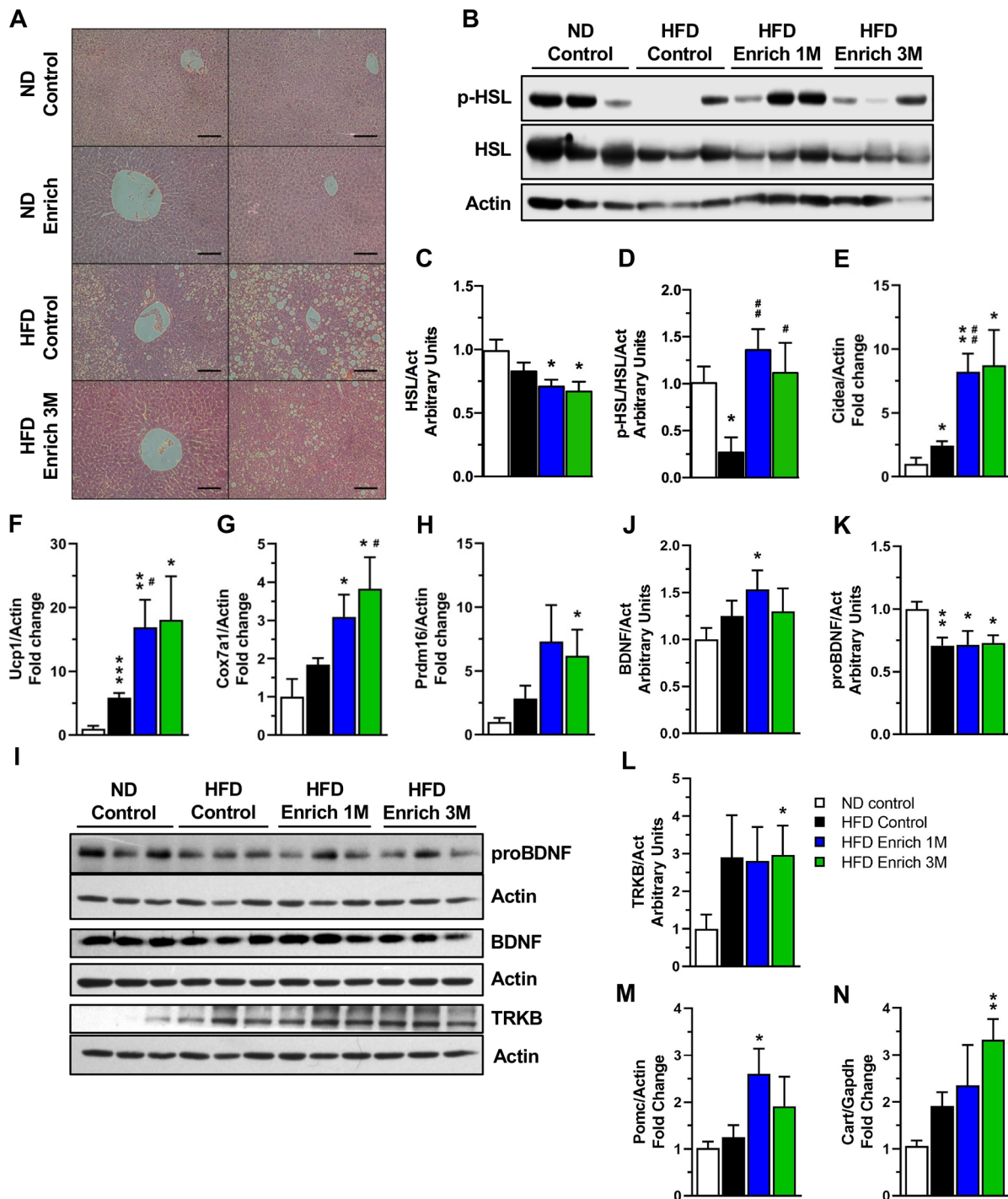


Fig. 4. An EE reduces hepatic steatosis, promotes white adipose tissue browning and increases anorexigenic markers in the hypothalamus.

(A) Representative photos of liver H&E staining. Scale bars: 100 μ m. (B) Representative western blot of HSL activation in epididymal WAT. (C,D) Densitometric analysis of protein levels of total HSL (C) and phosphorylated HSL Ser660 (p-HSL) (D) in WAT ($n=5$). (E-H) Gene expression of browning markers *Cidea* (E), *Ucp1* (F), *Cox7a1* (G) and *Prdm16* (H) in WAT ($n=5$). (I) Representative western blot of BDNF signaling pathway components in the hypothalamus. (J-L) Densitometric analysis of hypothalamic mature BDNF (BDNF) (J), BDNF precursor (proBDNF) (K) and TRKB (L) protein levels ($n=6$). (M,N) *Pomc* (M) and *Cart* (N) gene expression in hypothalamus ($n=3$). Data are mean \pm s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, versus ND control; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, versus HFD control (unpaired two-tailed t -test).

et al., 2006). However, many studies have observed that administration of HFD activates different inflammatory signaling pathways, such as IKK/NF- κ B and JNK pathways in the hypothalamus, leading to insulin and leptin resistance (Belgardt et al., 2010; Kleinriders et al., 2009; Zhang et al., 2008). As our

data show that enriched housing conditions decrease WAT inflammation, restore food intake and fasting glucose levels, re-establish glucose tolerance and improve insulin sensitivity in HFD-fed mice, we decided to evaluate the levels of certain components of the insulin signaling pathway in hypothalamus (Fig. 5A). We did

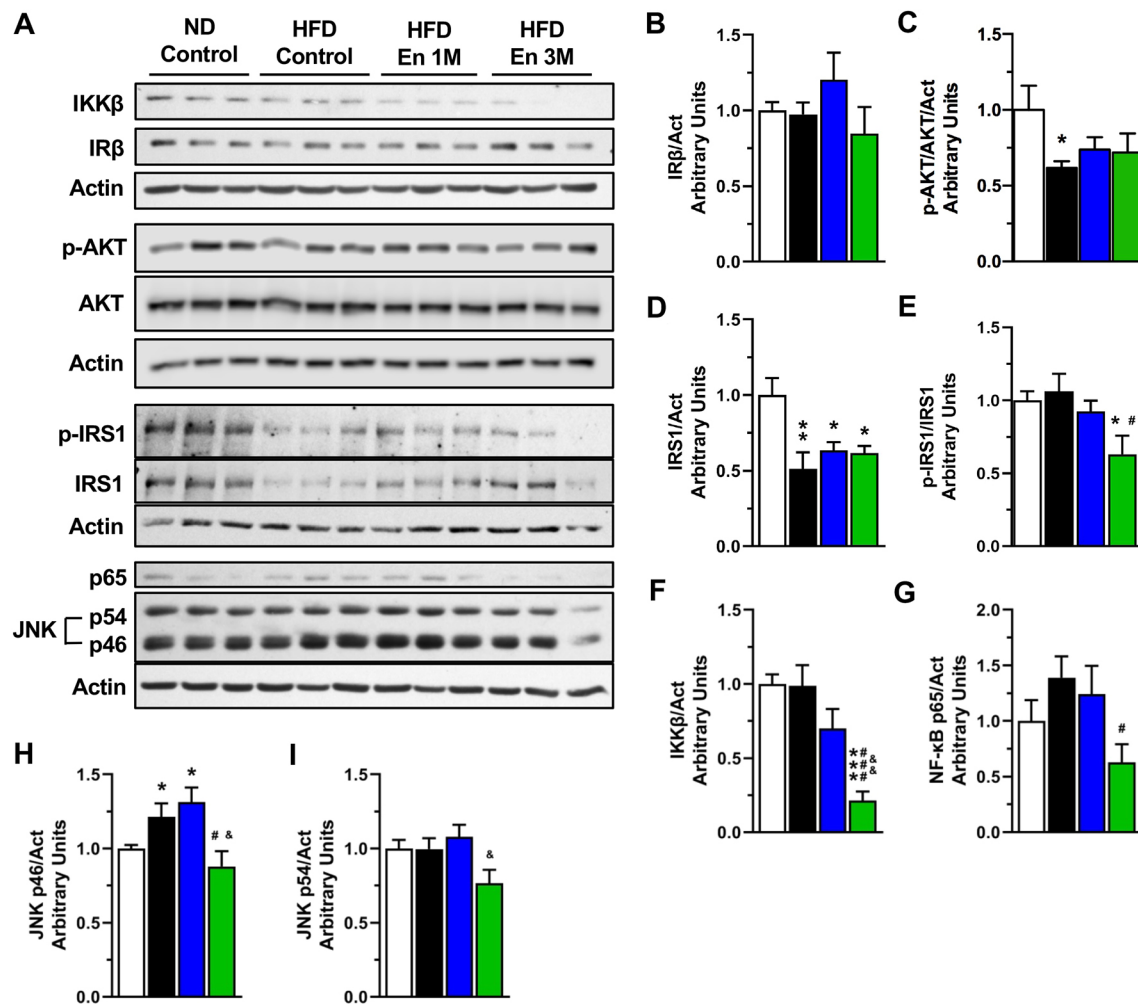


Fig. 5. An EE reduces hypothalamic inflammatory signaling. (A) Representative western blot of inflammatory and insulin signaling proteins in hypothalamus. (B-I) Densitometric analysis of insulin receptor β subunit (IR β) (B), phosphorylated AKT Ser473 (p-AKT) (C), IRS1 (D), phosphorylated IRS1 S307 (p-IRS1) (E), IKK β (F), NF- κ B subunit p65 (G), JNK p46 isoform (H) and JNK p54 isoform (I) protein levels in hypothalamus ($n=6$). Data are mean \pm s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, versus ND control; # $P<0.05$, #### $P<0.001$, versus HFD control; and & $P<0.05$, && $P<0.01$, versus HFD enriched 1 M (unpaired two-tailed t -test).

not observe any change in hypothalamic levels of IR β among all experimental groups (Fig. 5B). Even though we determined that HFD feeding decreased the levels of p-AKT compared to mice fed ND, we did not observe that an EE rescued AKT activation in the hypothalamus (Fig. 5C). Additionally, we found decreased insulin receptor substrate 1 (IRS1) levels in all mice groups fed with HFD (Fig. 5D). As the inflammatory kinases IKK β and JNK inhibit insulin signaling via IRS-1 phosphorylation on the serine 307 residue (Aguirre et al., 2002; Gao et al., 2002), we evaluated the levels of this inhibitory IRS-1 phosphorylation (Fig. 5E). Interestingly, we found that exposure to an EE for 3 months significantly reduced the levels of phosphorylated IRS-1 Ser³⁰⁷ in the hypothalamus of HFD-fed mice compared to HFD control mice (Fig. 5E). These observations prompted us to determine the hypothalamic inflammatory status under our experimental conditions (Fig. 5A). Mice fed with HFD and housed in an EE for 3 months (HFD Enriched 3 M) showed decreased hypothalamic protein levels of the inflammatory markers IKK β (Fig. 5F), NF- κ B subunit p65 (Fig. 5G), and JNK p46 isoform (Fig. 5H), compared to HFD control mice. Levels of JNK p54 isoform were also reduced in the hypothalamus of the HFD enriched 3 M mice with respect to HFD enriched 1 M mice (Fig. 5I). Interestingly, the

reduction in IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation (Fig. 5E) correlates with lower IKK β and JNK protein levels observed in the hypothalamus of obese mice housed for 3 months in the EE (HFD enriched 3 M group) (Fig. 5F,H,I). These results indicate that our EE protocol decreases the inflammatory process in the hypothalamus induced by a HFD, even in metabolically compromised mice. Overall, our study demonstrates that a EE is able to ameliorate the metabolic alterations caused by a HFD feeding. We show that the EE re-establishes the control of energy balance by reducing inflammation in the WAT and in the hypothalamus of obese mice.

DISCUSSION

During homeostasis, adipose tissue is in an anti-inflammatory state, in which adipocytes secrete adiponectin and macrophages show an anti-inflammatory M2 profile (Lumeng et al., 2007; Ouchi et al., 2011; Zeyda et al., 2007). Overnutrition increases the levels of inflammatory molecules, such as TNF, IL-6, CCL2 and CCL3, in adipocytes, which activate resident macrophages, leading to the recruitment of more immune cells (Ouchi et al., 2011). In addition, inflammatory signaling, mediated by cytokines or pattern recognition receptors, activate JNK and IKK kinases, which

regulate insulin resistance by phosphorylating IRS, which prevents its activation by the insulin receptor (Aguirre et al., 2002; Gao et al., 2002). Using a model of DIO, we confirmed that HFD feeding increases macrophage recruitment and the levels of proinflammatory cytokines in WAT, increases lipid accumulation in liver, and leads to development of glucose intolerance and insulin resistance in mice.

Previous studies have shown that inhibiting inflammation or promoting an anti-inflammatory state in adipose tissue can improve the metabolism of obese mice. Deletion of JNK1 in adipose tissue reduces IL-6 levels, preventing insulin resistance and hepatic steatosis in a DIO model (Sabio et al., 2008). Furthermore, promoting macrophage M2 polarization decreases inflammation and increases browning markers in adipose tissue, reduces hepatic steatosis and restores glucose tolerance and insulin sensitivity in HFD-fed mice (Zhao et al., 2018). In agreement with these data, we found that exposure to an EE reduces the levels of chemokines involved in immune cells recruitment (such as CCL2, CCL5, CCL9, CCL11, CCL24 and CXCL1), as well as pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF and IL-6, in WAT of mice fed with HFD. These data correlate with reduced infiltration of CD68⁺ and CD163⁺ macrophages in WAT of obese mice housed in our EE conditions. In accordance with these results, we have recently shown that HFD-fed mice with reduced adipose tissue inflammation have improved insulin sensitivity and glucose tolerance (Salazar-León et al., 2019), without changes in weight gain. Moreover, studies in humans have shown that obese patients with insulin sensitivity have reduced macrophage infiltration and chemokine expression in adipose tissue (Hardy et al., 2012; Klötting et al., 2010). Likewise, it is known that an EE alters the activation of the immune system, promoting an anti-inflammatory phenotype of T cells and macrophages (Chabry et al., 2015; Xiao et al., 2019). In accordance with this, we found that the EE increases the levels of IL-4 and IL-10 in WAT, which favors an M2 and anti-inflammatory milieu in adipose tissue, as described previously (Ji et al., 2012; Lumeng et al., 2007). This suggests that an EE could skew the activation state of immune cells to favor an anti-inflammatory profile in HFD-fed mice. Still, the presence of other immune cell populations and their activation state in our experimental conditions remains to be determined. Collectively, our results show that environmental enrichment could be an effective therapeutic approach against obesity-induced adipose tissue inflammation to restore glucose homeostasis.

Results regarding the effects of EE on body weight have been contradictory. Although some studies have reported that mice housed in EE and fed with ND present reduced weight (Cao et al., 2011), others have not seen such a difference (Mainardi et al., 2010; Tsai et al., 2002). In our experimental conditions, we did not find a significant difference in weight, or in other metabolic parameters, between mice fed with ND in control or EE housing conditions, which could be explained by the absence of running wheels (exercise) in our EE paradigm.

In HFD-fed mice, we found that EE caused weight loss during the first 4 weeks of the change in housing conditions. This effect was probably caused by a decrease in food intake, albeit the influence of increased physical activity might play a role in reducing weight. Nevertheless, we cannot attribute all the beneficial effects of EE to weight loss given that we observed decreased fasting glucose levels, as well as increased glucose tolerance and insulin sensitivity in obese mice (HFD enriched 3 M group). Nonetheless, we found that insulin signaling in the liver was only enhanced in the HFD enriched 1 M group, even though we observed an improvement in glucose

tolerance of both HFD enriched groups (1 M and 3 M). The increase in glucose clearance observed in the HFD enriched 3 M group could suggest increased glucose effectiveness in our mice (Tonelli et al., 2005), which is known to be impaired in HFD-fed mice (Ahrén and Pacini, 2002). Previous studies have shown that weight loss in mice has rapid effects on insulin sensitivity and inflammation in liver (Schmitz et al., 2016), even though inflammation persists in adipose tissue for a longer period of time. These findings might explain the increase in insulin signaling we observed in the HFD enriched 1 M group, although other factors could also be influencing the beneficial effects of an EE in liver. In this regard, a systemic reduction in inflammation (specifically in the adipose tissue, liver and brain) has been shown to increase insulin signaling in liver (Arkan et al., 2005; Belgardt et al., 2010; Sabio et al., 2008; Yuan et al., 2001).

Most research has focused on the effect of a complete EE in different pathologies; however, other studies have tried to elucidate the contribution of different components of an EE. In some models, exercise has been shown to account for most of the beneficial effects of the EE (Brenes et al., 2016; Prado Lima et al., 2018). However, other studies have shown that the combination of different components (physical, social or cognitive stimulation) of EE provide a better effect than each component by itself (Grégoire et al., 2014; Langdon and Corbett, 2012). Accordingly, exercise alone cannot recapitulate the full effects of a complete EE on reducing adiposity or modifying gene expression in hypothalamus and in different fat depots (Cao et al., 2011). Overall, these data cannot explain how each component of an EE contributes to the beneficial effects observed in our experimental conditions, which would need further characterization.

In the adipose tissue, the inflammatory process associated with obesity is able to mediate catecholamine resistance, impairing UCP1 upregulation and HSL phosphorylation (Mowers et al., 2013). Likewise, studies in aged mice have shown that the NOD-like receptor family containing pyrin domain 3 (NLRP3)-dependent inflammation in WAT macrophages impairs catecholamine-induced lipolysis by increasing catecholamine catabolism genes (Camell et al., 2017). In our model, we observed that HFD decreased HSL phosphorylation, whereas EE maintained the levels of phosphorylated HSL, suggesting that EE sustains WAT lipolysis in obese mice. Previous studies have shown that catecholamine release by the sympathetic nervous system, and the activation of the β -adrenergic signaling pathway in adipose tissue, promotes browning (Harms and Seale, 2013). WAT browning increases energy expenditure and has beneficial effects on thermogenesis and metabolism (Boström et al., 2012; Seale et al., 2011). In our study, we found that EE increased the expression of browning markers in WAT of mice fed with HFD, including *Ucp1*. This suggests that under our experimental conditions, EE could enhance catecholamine release or re-establish catecholamine signaling in WAT to mediate the beneficial effects observed in glucose metabolism. In addition to this, catecholamines can regulate immune function and reduce macrophage inflammatory response (Barnes et al., 2015). These observations, together with our data, raise the question of whether reduced inflammation improves catecholamine signaling, or whether increasing catecholaminergic signaling reduces inflammation in WAT. Further studies are required to test these hypotheses.

Even though we observed increased HSL activation and *Ucp1* expression in the WAT of the HFD enriched 3 M group, these mice gained weight after an initial weight loss after the change in housing conditions. These results suggest that, although there is no

inhibition in catecholamine signaling, energy expenditure could still be impaired. Previous studies have shown that increase in β -adrenergic-mediated cellular respiration is diminished in white adipocytes from obese patients (Yehuda-Shnaidman et al., 2010), even though lipolysis was unaffected. Furthermore, stimulation of β -adrenergic receptors in mice with a deficiency of STAT3 in adipocytes increased HSL activation and lipolysis but not fatty acid utilization and oxygen consumption (Reilly et al., 2020). Further studies are required to clarify the mechanisms regulating the improvement of glucose metabolism even in the presence of weight gain, as well as whether an EE mediates an increase in energy expenditure in HFD-fed mice.

EE has been shown to promote WAT browning by increasing norepinephrine release mediated by hypothalamic BDNF overexpression (Cao et al., 2011). Within the hypothalamus, BDNF has been shown to be part of the energy balance circuitry by regulating food intake (Bariohay et al., 2005; Xu et al., 2003). Previous studies have reported that EE increases BDNF in the brain, particularly in the hypothalamus, and that BDNF mediates many of the beneficial effects attributed to the EE (Bakos et al., 2009; Cao et al., 2011; Mainardi et al., 2010; Xiao et al., 2019). In the present study, we observed that a 1-month exposure to the EE increased mature BDNF, whereas the precursor form of BDNF was reduced. These results suggest that EE increases BDNF processing, which has been reported previously (Cao et al., 2014). However, the increase in mature BDNF levels observed in the HFD enriched 1 M group was not maintained after 3 months, but the browning markers in WAT were still increased. These data suggest that the beneficial effects of our EE protocol on the adipose tissue are mediated by different signaling pathways activated in a time-dependent manner. We propose that a short exposure to an EE induces browning markers in HFD-fed mice by a BDNF-dependent mechanism, whereas a long exposure might be independent of BDNF signaling or sustained even when BDNF levels are no longer increased.

In brain, obesity leads to an inflammatory process that impairs both insulin and leptin signaling in the hypothalamus, exacerbating obesity (Jais and Brüning, 2017). Accordingly, the inhibition of JNK or IKK/NF- κ B signaling in hypothalamic neurons decreases weight gain and improves insulin signaling in models of DIO models (Belgardt et al., 2010; Benzler et al., 2013; Sabio et al., 2010). Furthermore, inhibiting inflammation can rescue learning and memory in HFD-fed mice (Lu et al., 2011). In this regard, EE has been shown to restore the cognitive impairment associated with obesity (Gergerlioglu et al., 2016), suggesting that EE might reduce the inflammatory process in the brain generated by HFD feeding. EE has also been shown to decrease IL-1 β and CD68 expression in the hippocampus, as well as prevent cognitive decline in aged mice, even in the absence of running wheels (Birch and Kelly, 2019). In the present study, we found that exposure to an EE for 3 months significantly decreased JNK, IKK and NF- κ B protein levels in the hypothalamus of HFD-fed mice, which further indicates that an EE is capable of reducing inflammation in the hypothalamus.

Hypothalamic IKK/NF- κ B activation in response to dietary obesity induces neurodegeneration and inhibits neurogenesis, affecting neuronal phenotypes associated with energy balance, including the anorexigenic proopiomelanocortin (POMC) neurons (Li et al., 2012; Moraes et al., 2009). Congruently, the implantation of hypothalamic stem cells with impaired IKK/NF- κ B signaling in HFD-fed mice increases neurogenesis and POMC neuronal differentiation, and reduces body weight, food intake, glucose

intolerance and insulin levels (Li et al., 2014). The anorexigenic neurohormone CART has also been implicated in feeding behavior and energy expenditure (Lau et al., 2018). CART colocalizes with POMC in the arcuate nucleus of the hypothalamus, where *Cart* mRNA levels are increased following feeding or increased leptin levels (Elias et al., 1998; Germano et al., 2007). Interestingly, here, we report that *Pomc* and *Cart* transcript levels were significantly upregulated in HFD-fed mice exposed to EE for 1 month and 3 months, which correlates with a decrease in food intake, glucose intolerance and blood glucose levels in these mice. Therefore, further experiments are required to determine whether EE regulates *Pomc* and *Cart* expression in different hypothalamic nuclei. These data also raise the question as to whether an EE promotes neuronal regeneration, leading to increased anorexigenic signaling as part of the mechanism to regulate glucose metabolism in obese mice.

There is ample evidence about the beneficial effects of EE in brain physiology, cognition and in different disease models in both mice and rats. However, transferring what is known in murine models to treat patients has proven challenging. Some studies have managed to translate the different components of an EE (including physical, cognitive, social and somatosensorial stimulation) into clinical settings to treat stroke, neurodevelopmental disorders, age-related cognitive decline and neurodegenerative diseases (Ball et al., 2019; Clemenson et al., 2020; McDonald et al., 2018; Pradhan, 2019). In recovering stroke patients, an EE has been shown to increase engagement in physical, social or cognitive activities, improve motor performance and diminish depression and anxiety levels (Janssen et al., 2014; Rosbergen et al., 2017; Vive et al., 2020). Furthermore, an EE can improve cognition and ameliorate autism symptoms in children with autism (Woo and Leon, 2013; Woo et al., 2015). Based on the present study showing the anti-inflammatory properties of our EE protocol, it is important to consider the clinical application of an EE to treat obesity-associated inflammation to prevent the development of other pathologies, such as cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer and type II diabetes. The design of sensory therapy rooms using similar components of an EE as those described previously (Ball et al., 2019; Clemenson et al., 2020; McDonald et al., 2018; Pradhan, 2019), including physical, cognitive (e.g. playing an instrument, reading, listening to a podcast, crosswords, puzzles, writing and games), social (e.g. communal socialization and group activities) and somatosensorial (e.g. crafts, singing, stimulation and bouncing a ball) stimulation, in clinical settings should be considered as a potential intervention to complement current treatment options and lifestyle changes (Glechner et al., 2018) used to treat the metabolic alterations in obese/diabetic patients.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6N male mice (6–7 weeks old; Envigo) were randomized into standard housing conditions (21 cm width \times 29 cm long \times 16 cm height per cage, with 5 mice per cage) and fed with either regular chow diet (ND, 30 mice) (2018SX; Envigo Teklad Global) or with HFD (44 mice) (Research Diets, D12492). After 13 weeks, mice were divided to be either maintained in the control housing conditions or to be switched to an EE with the same diet, forming five experimental groups: ND control housing (ND control, 15 mice); ND EE (ND enriched, 15 mice); HFD control housing (HFD control, 15 mice); HFD EE 1 month (HFD enriched 1 M, 14 mice); and HFD EE 3 months (HFD enriched 3 M, 15 mice). The mice were distributed between housing condition groups in a way that minimized the difference in mean weight (for each diet). The EE housing conditions consisted of large cages (32 cm width \times 88 cm long \times 47.6 cm height per cage; 15 mice per cage)

supplemented with plastic tunnels, wood and plastic toys, cardboard boxes and glass jars. The toys and their locations were changed once a week. Mice were maintained on a normal 12 h/12 h light/dark cycle with the corresponding diet and water *ad libitum*. The body weight of each mouse was recorded weekly. Food intake was recorded as the total food consumption of each cage housing five (control) or 15 (enriched) mice, and was represented as the average food intake per mouse per week. Metabolic tests were performed at week 17 for the HFD enriched 1 M mice and at week 25 for the other groups. The animals were sacrificed by CO₂ inhalation after 18 (HFD enriched 1 M) or 26 (ND control, ND enriched, HFD control and HFD enriched 3 M) weeks on the experimental settings; blood and tissue were harvested for further use. The Institutional Bioethical Committee approved all animal experiments described in this study.

Glucose and insulin tolerance test

A glucose tolerance test (GTT) and an insulin tolerance test (ITT) were performed at different timepoints during our experiments to evaluate the effect of diet and environmental conditions on glucose metabolism. Twenty mice from each diet group were selected after 11 weeks of ND or HFD feeding, and divided between the GTT and ITT so that their mean weight was similar between the same diet group ($n=10$). After the separation in environmental conditions, the GTT and ITT were performed after 17 experimental weeks for the HFD enriched 1 M mice ($n=5$), or after 25 experimental weeks for the other groups (ND control, ND enriched, HFD control and HFD enriched 3 M).

For the GTT and ITT, animals were fasted for 6 h leading up to the test from 8:00 to 14:00. Each mouse received an intraperitoneal injection with glucose (1.8 gr/kg) or insulin (Humulin R, 1 U/kg) for the glucose or insulin resistance test, respectively. The concentration of blood glucose was measured using a glucometer (Accu-Chek, Roche) at 0, 15, 30, 60 and 120 min post-injection.

Area under the curve

The area under the curve (AUC) for both the ITT and GTT was calculated using Tai's formula (Tai, 1994):

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

where X =time (0, 15, 30, 60, 120 min), and Y =glucose (mg/dl) levels at each timepoint.

Tissue preparation, serum harvesting and biomarker measurements

Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and stored at 4°C or at -70°C until use. Blood samples, obtained by cardiac puncture, were incubated at 4°C for 2 h to promote clot formation, and were then spun at 135 g for 10 min. The serum was then collected and stored at -70°C until use.

The sera from three mice of each group was pooled before performing biomarker measurements. Circulating insulin levels were quantified in blood sera by ELISA using the Mouse Insulin ELISA Kit ALPCO (80-INSMS-E01) following the manufacturer's protocols ($n=3$ serum pools per group).

Adipose tissue immunohistochemistry

Epididymal WAT was collected, fixed using 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Two 1- μ m-thick sections were prepared, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol series and then stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Analysis of adipocyte histology was performed using ImageJ software according to the manual procedure (Abramoff et al., 2004). Immune cell infiltration in the adipose tissue was quantified by calculating the infiltration ratio of ten fields (10 \times) from three slides of each individual mouse, with a total of five mice per group. Light microscope images were acquired using a Nikon Eclipse Ci-L microscope with an Infinity1 Lumenera color camera.

Immunohistochemistry was performed on 2- μ m-thick sections deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded ethanol series.

Antigen retrieval was performed by immersing the slides in antigen retrieval buffer [100 \times citrate buffer (pH 6); Abcam, ab93678] for 25 min in boiling water. Endogenous peroxidase activity was inhibited by 3% H₂O₂-methanol treatment for 20 min, and background non-specific binding was reduced by incubating with 1% fetal bovine serum in 1 \times PBS (pH 7.4) for 30 min. Sections were incubated overnight at room temperature with anti-CD163 (1:100 dilution, Invitrogen, 14-1631-82) or anti-CD68 (1:150 dilution, Invitrogen, 14-0681-82) antibodies. Goat anti-rat horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (HRP polymer, Abcam, ab214882) was then added for 40 min at room temperature. The slides were then washed five times in 1 \times PBS (pH 7.4), and incubated for 30 min at room temperature with streptavidin-HRP. The antigen-antibody complex was visualized using DAB chromogen (Abcam, ab64238). After stopping the reaction with distilled water, the sections were counterstained with Hematoxylin, washed in distilled water for 5 min and dehydrated sequentially in 70%, 90% and 100% ethanol, ethanol/xylene and xylene. The stained sections were visualized using a Nikon Eclipse Ci-L microscope with an Infinity1 Lumenera color camera and analyzed using Image-Pro Express version 6.0 software (Media Cybernetics). Ten randomly selected images per slide from five individual mice per group were taken at 20 \times magnification.

Liver histochemistry

Liver tissue was mounted in Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek) and frozen for sectioning. Liver slides were stained with H&E. Ten images, randomly selected per slide from three individual mice per group, were taken at 20 \times magnification to visualize lipid droplets. Light microscopic images were acquired using a Zeiss LSM510/UV Axiovert 200 M confocal microscope with a Nikon Coolpix 5000 camera.

Protein extracts

Frozen epididymal WAT was cut into pieces in 400-600 μ l lysis buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 137 mM NaCl, 25 mM β -glycerophosphate (pH 7.4), 2 mM PPI_{Na}, 2 mM EDTA (pH 7.4), 1% Triton X-100 and 10% glycerol]. Samples were incubated on ice for 1 h, and then centrifuged at 19,700 g at 4°C; the supernatants were recovered and stored at -70°C. Total protein extracts were quantified by the bicinchoninic acid method.

For liver and hypothalamus, samples were thawed in 300-500 μ l of lysis buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 137 mM NaCl, 25 mM β -glycerophosphate (pH 7.4), 2 mM PPI_{Na}, 2 mM EDTA (pH 7.4), 1% Triton X-100 and 10% glycerol] supplemented with 1 \times complete protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitors (200 mM Na₃VO₄, 0.1 mM dithiothreitol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The tissue was sonicated and the homogenate was incubated on ice for 10 min. Samples were spun at 14,500 rpm at 4°C, and supernatants were recovered and stored at -70°C. Total protein extracts were quantified using the Bradford method.

Western blotting

Proteins (15-30 μ g) were resolved on polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare Life Sciences). The membrane was blocked with 5% skimmed milk dissolved in TBS-T [20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] at room temperature for 1 h, and finally incubated with the corresponding primary antibody at 4°C overnight. The secondary antibody coupled to HRP was incubated for 1 h at room temperature in 5% milk in TBS-T or 5% bovine serum albumin in TBS-T. After washing, immune complexes were visualized using chemiluminescence with ECL Western Lighting detection reagents following the manufacturer's instructions. Densitometry analysis was performed using a Gel-Doc XR+ (Bio-Rad) and Image Lab version 6.0.1 software (Bio-Rad), or using a C-DiGit 3600 Blot Scanner (LI-COR Biosciences) and Image Studio Software version 5.2.5 (LI-COR Biosciences).

The following antibodies were used: phosphorylated AKT (p-AKT Ser473, 1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-9271); AKT (1:3000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-9272); insulin receptor β (IR β , 1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-3020); JNK (1:2000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-9252); IKK β (1:1000 dilution; Cell

Signaling Technology, CS-2370); NF- κ B p65 (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-4764); IRS-1 (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-2382); phosphorylated IRS (p-IRS Ser307, 1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-2381); BDNF (recognizes proBDNF and BDNF, 1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, sc-546); TRKB (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, sc-8316); HSL (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-4107); phosphorylated HSL (p-HSL Ser660, 1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, CS-4126); and actin (1:6000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, sc-1616).

ELISA

Cytokine levels in the epididymal WAT were determined from total protein extracts using the IL-1 β (432605), IL-4 (431101), IL-6 (431304), IL-10 (431414) and TNF (430904) ELISA MAX Deluxe Sets (BioLegend) following the manufacturer's instructions.

Adipose tissue inflammatory profile

Protein extracts from the epididymal WAT were prepared as described above. The adipose tissue inflammatory profile was determined using the mouse cytokine antibody array C1 RayBio C-Series (AAM-INF-1-4). Arrays were probed with 250 μ g of protein extracts following the manufacturer's instructions. The antibody-antigen interactions were visualized using chemiluminescence with a LI-COR Biosciences instrument. Densitometry was performed using Image Studio Software version 5.2.5.

RNA extraction, reverse transcription and qPCR

Total RNA was isolated from epididymal WAT TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, 15596026) following the manufacturer's instructions except for two additional steps. First, before adding isopropanol, TRIzol: sample homogenate was briefly centrifuged for 1 min at 15,800 g and the top lipid layer was discarded from all samples. Second, an extra 100% ethanol wash was performed before the regular 70-75% ethanol washes, as suggested by the product's protocol. RNA concentration was determined using a Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Total RNA (500 ng) of each sample was retrotranscribed using oligo dT, random hexamers (Thermo Fisher Scientific, N8080127) and the thermostable M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, 28025013) following the manufacturer's directions. At the end of the reverse transcription reaction, 20 μ l of cDNA was diluted 1:10 in water. Finally, 1 μ l of each diluted cDNA was used for qPCR assays according to the instructions from the Maxima SYBR Green/ROX 2X qPCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, K0221) with a temperature of 60°C using a StepOne Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, 4376357).

For the hypothalamus, total RNA was isolated as described previously (Pérez-Martínez et al., 1998) pooling two hypothalami for each sample. Hypothalamic RNA (1 μ g) was retrotranscribed using oligo dT and M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, 28025013) following the manufacturer's directions.

Primers were designed to specifically recognize and amplify mouse genes in the qPCR assays. All the primers used in this study are listed in Table S2.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm s.e.m. An unpaired two-tailed t -test was used to compare group pairs. Data were also analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test, and two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test or Bonferroni post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical significance tests were performed using GraphPad Prism version 9.0 for Windows.

Acknowledgements

We thank Oswaldo López-Gutiérrez for technical support; X. Alvarado at the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (UNAM) for image acquisition; S. Rodríguez at the Unidad de Histología (Instituto de Fisiología Celular-UNAM); and G. Cabeza and E. Mata for animal care.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: L.P.-M.; Methodology: S.D.d.L.-G., L.P.-M.; Validation: S.D.d.L.-G., J.S.-L., K.F.M.-S., D.V.-G., D.A.-L.; Formal analysis: S.D.d.L.-G., J.S.-L., K.F.M.-S., D.V.-G., D.A.-L., L.P.-M.; Investigation: S.D.d.L.-G., L.P.-M.; Resources: L.P.-M.; Writing - original draft: S.D.d.L.-G., K.F.M.-S., L.P.-M.; Writing - review & editing: S.D.d.L.-G., K.F.M.-S., D.V.-G., G.P.-A., L.P.-M.; Visualization: S.D.d.L.-G., J.S.-L.; Supervision: G.P.-A., L.P.-M.; Project administration: G.P.-A., L.P.-M.; Funding acquisition: G.P.-A., L.P.-M.

Funding

This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN213119 and IN213316 to L.P.-M., and IN211719 and IN212316 to G.P.-A.) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; IFC 2016-2282 and 155290 to L.P.-M., and 154542 to G.P.-A.). S.D.d.L.-G. is a PhD student enrolled in the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México and is a recipient of a CONACYT fellowship (384817). J.S.-L. is a PhD student enrolled in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and is a recipient of a CONACYT fellowship (244063).

References

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36-42.
- 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 1531-1537. doi:10.1074/jbc.M101521200
- Ahrén, B. and Pacini, G. (2002). Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, 738-744. doi:10.1152/ajpendo.00199.2002
- 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. *Nat. Med.* **11**, 191-198. doi:10.1038/nm1185
- 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 Res.* **13**, 415-428. doi:10.1089/rej.2009.0989
- 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. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.054
- Ball, N. J., Mercado, E. and Orduña, I. (2019). Enriched environments as a potential treatment for developmental disorders: a critical assessment. *Front. Psychol.* **10**, 466. doi:10.3389/fpsyg.2019.00466
- Bariohay, B., Lebrun, B., Moysé, E. and Jean, A. (2005). Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology* **146**, 5612-5620. doi:10.1210/en.2005-0419
- Barneda, D., Planas-Iglesias, J., Gaspar, M. L., Mohammadyani, D., Prasannan, S., Dormann, D., Han, G.-S., Jesch, S. A., Carman, G. M., Kagan, V. et al. (2015). The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *Elife* **4**, e07485. doi:10.7554/eLife.07485
- Barnes, M. A., Carson, M. J. and Nair, M. G. (2015). Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine* **72**, 210-219. doi:10.1016/j.cyto.2015.01.008
- Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. and Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS ONE* **8**, e80908. doi:10.1371/journal.pone.0080908
- Belgardt, B. F., Mauer, J., Wunderlich, F. T., Ernst, M. B., Pal, M., Spohn, G., Brönneke, H. S., Brodessa, S., Hampel, B., Schauss, A. C. et al. (2010). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 6028-6033. doi:10.1073/pnas.1001796107
- Benzler, J., Ganjam, G. K., Legler, K., Stöhr, 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. *J. Neuroendocrinol.* **25**, 446-454. doi:10.1111/jne.12018
- Birch, A. M. and Kelly, Á. M. (2019). Lifelong environmental enrichment in the absence of exercise protects the brain from age-related cognitive decline. *Neuropharmacology* **145**, 59-74. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.03.042
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Boström, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z. et al. (2012). APOC1- α

- dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468. doi:10.1038/nature10777
- Brenes, J. C., Lackinger, M., Höglinger, G. U., Schratz, G., Schwarting, R. K. W. and Wöhr, M.** (2016). Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. *J. Comp. Neurol.* **524**, 1586-1607. doi:10.1002/cne.23842
- Camell, C. D., Sander, J., Spadaro, O., Lee, A., Nguyen, K. Y., Wing, A., Goldberg, E. L., Youm, Y.-H., Brown, C. W., Elsworth, J. et al.** (2017). Inflammation-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature* **550**, 119-123. doi:10.1038/nature24022
- Cao, L., Choi, E. Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X. and Doring, M. J.** (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab.* **14**, 324-338. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.020
- Cao, W., Duan, J., Wang, X., Zhong, X., Hu, Z., Huang, F., Wang, H., Zhang, J., Li, F., Zhang, J. et al.** (2014). Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behav. Brain Res.* **265**, 76-83.
- Chabry, J., Nicolas, S., Cazareth, J., Murriss, E., Guyon, A., Glaichenhaus, N., Heurteaux, C. and Petit-Paitel, A.** (2015). Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. *Brain. Behav. Immun.* **50**, 275-287. doi:10.1016/j.bbi.2015.07.018
- Clemenson, G. D., Stark, S. M., Rutledge, S. M. and Stark, C. E. L.** (2020). Enriching hippocampal memory function in older adults through video games. *Behav. Brain Res.* **390**, 112667. doi:10.1016/j.bbr.2020.112667
- 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. *Physiol. Behav.* **81**, 243-248. doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.006
- de Luca, C. and Olefsky, J. M.** (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* **582**, 97-105. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.057
- 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. doi:10.1210/en.2004-1520
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. and Elmquist, J. K.** (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* **21**, 1375-1385. doi:10.1016/S0896-6273(00)80656-X
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S. and Rodríguez, A.** (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr. Res. Rev.* **27**, 63-93. doi:10.1017/S095442241400002X
- Gaidhu, M. P., Anthony, N. M., Patel, P., Hawke, T. J. and Ceddia, R. B.** (2010). Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C961-C971. doi:10.1152/ajpcell.00547.2009
- 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 48115-48121. doi:10.1074/jbc.M209459200
- Gergerlioglu, H. S., Oz, M., Demir, E. A., Nurullahoglu-Atalik, K. E. and Yerlikaya, F. H.** (2016). Environmental enrichment reverses cognitive impairments provoked by Western diet in rats: Role of corticosteroid receptors. *Life Sci.* **148**, 279-285. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.011
- Germano, C. M. R., de Castro, M., Rotaro, R., Laguna, M. T. C., Antunes-Rodrigues, J., Elias, C. F. and Elias, L. K. (2007). Time course effects of adrenalectomy and food intake on cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the hypothalamus. *Brain Res.* **1166**, 55-64. doi:10.1016/j.brainres.2007.05.077**
- Glechner, A., Keuchel, L., Affengruber, L., Titscher, V., Sommer, I., Matyas, N., Wagner, G., Kien, C., Klerings, I. and Gartlehner, G.** (2018). Effects of lifestyle changes on adults with prediabetes: a systematic review and meta-analysis. *Prim. Care Diabetes* **12**, 393-408. doi:10.1016/j.pcd.2018.07.003
- 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. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.07.079
- Goldfine, A. B. and Shoelson, S. E.** (2017). Therapeutic approaches targeting inflammation for diabetes and associated cardiovascular risk. *J. Clin. Invest.* **127**, 83-93. doi:10.1172/JCI88884
- Grégoire, C.-A., Bonenfant, D., Le Nguyen, A., Aumont, A. and Fernandes, K. J. L.** (2014). Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. *PLoS ONE* **9**, e86237. doi:10.1371/journal.pone.0086237
- Gregor, M. F. and Hotamisligil, G. S.** (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415-445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322
- Gurfein, B. T., Hasdemir, B., Milush, J. M., Touma, C., Palme, R., Nixon, D. F., Darcel, N., Hecht, F. M. and Bhargava, A.** (2017). Enriched environment and stress exposure influence splenic B lymphocyte composition. *PLoS ONE* **12**, e0180771. doi:10.1371/journal.pone.0180771
- Hardy, O. T., Perugini, R. A., Nicoloso, S. M., Gallagher-Dorval, K., Puri, V., Straubhaar, J. and Czech, M. P.** (2012). Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **7**, 60-67. doi:10.1016/j.soard.2010.05.013
- Harms, M. and Seale, P.** (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252-1263. doi:10.1038/nm.3361
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M. and Hotamisligil, G. S.** (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336. doi:10.1038/nature01137
- Hotamisligil, G. S.** (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867. doi:10.1038/nature05485
- Jais, A. and Brüning, J. C.** (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 24-32. doi:10.1172/JCI88878
- Janssen, H., Ada, L., Bernhardt, J., McElduff, P., Pollack, M., Nilsson, M. and Spratt, N. J.** (2014). An enriched environment increases activity in stroke patients undergoing rehabilitation in a mixed rehabilitation unit: a pilot non-randomized controlled trial. *Disabil. Rehabil.* **36**, 255-262. doi:10.3109/09638288.2013.788218
- 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. *J. Biol. Chem.* **287**, 13561-13571. doi:10.1074/jbc.M112.350066
- Jocken, J. W. E. and Blaak, E. E.** (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* **94**, 219-230. doi:10.1016/j.physbeh.2008.01.002
- Kleinridders, A., Schenten, D., Könnner, A. C., Belgardt, B. F., Mauer, J., Okamura, T., Wunderlich, F. T., Medzhitov, R. and Brüning, J. C.** (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab.* **10**, 249-259. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.013
- Klötting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., Schön, M. R., Kern, M., Stumvoll, M. and Blüher, M.** (2010). Insulin-sensitive obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E506-E515. doi:10.1152/ajpendo.00586.2009
- Koyama, Y. and Brenner, D. A.** (2017). Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 55-64. doi:10.1172/JCI88881
- Langdon, K. D. and Corbett, D.** (2012). Improved working memory following novel combinations of physical and cognitive activity. *Neurorehabil. Neural Repair* **26**, 523-532. doi:10.1177/1545968311425919
- Lau, J., Farzi, A., Qi, Y., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Shi, Y. C. and Herzog, H.** (2018). CART neurons in the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area exert differential controls on energy homeostasis. *Mol. Metab.* **7**, 102-118. doi:10.1016/j.molmet.2017.10.015
- Laviola, G., Hannan, A. J., Macri, S., Solinas, M. and Jaber, M.** (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol. Dis.* **31**, 159-168. doi:10.1016/j.nbd.2008.05.001
- Li, J., Tang, Y. and Cai, D.** (2012). IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 999-1012. doi:10.1038/ncb2562
- Li, J., Tang, Y., Purkayastha, S., Yan, J. and Cai, D.** (2014). Control of obesity and glucose intolerance via building neural stem cells in the hypothalamus. *Mol. Metab.* **3**, 313-324. doi:10.1016/j.molmet.2014.01.012
- Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z. and Shan, Q.** (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 1658-1667. doi:10.1016/j.bbi.2011.06.009
- Lumeng, C. N. and Saltiel, A. R.** (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **121**, 2111-2117. doi:10.1172/JCI57132
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R.** (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175-184. doi:10.1172/JCI29881
- Luo, J., Quan, J., Tsai, J., Hobensack, C. K., Sullivan, C., Hector, R. and Reaven, G. M.** (1998). Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **47**, 663-668. doi:10.1016/S0026-0495(98)90027-0
- Mainardi, M., Scabia, G., Vottari, T., Santini, F., Pinchera, A., Maffei, L., Pizzorusso, T. and Maffei, M.** (2010). A sensitive period for environmental regulation of eating behavior and leptin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16673-16678. doi:10.1073/pnas.0911832107
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorff, E. and Sachser, N.** (2003). Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm. Behav.* **43**, 281-292. doi:10.1016/S0018-506X(03)00002-3
- Maurer, S. F., Fromme, T., Grossman, L. I., Hüttemann, M. and Klingenspor, M.** (2015). The brown and brite adipocyte marker Cox7a1 is not required for non-shivering thermogenesis in mice. *Sci. Rep.* **5**, 17704. doi:10.1038/srep17704

- McDonald, M. W., Hayward, K. S., Rosbergen, I. C. M., Jeffers, M. S. and Corbett, D. (2018). Is environmental enrichment ready for clinical application in human post-stroke rehabilitation? *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 1-16. doi:10.3389/fnbeh.2018.00135
- Meng, Z., Liu, T., Song, Y., Wang, Q., Xu, D., Jiang, J., Li, M., Qiao, J., Luo, X., Gu, J. et al. (2019). Exposure to an enriched environment promotes the terminal maturation and proliferation of natural killer cells in mice. *Brain. Behav. Immun.* **77**, 150-160. doi:10.1016/j.bbi.2018.12.017
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., Pauli, J. R., Romanatto, T., Carvalheira, J. B., Oliveira, A. L. R., Saad, M. J. et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE* **4**, e5045. doi:10.1371/journal.pone.0005045
- 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. doi:10.1038/nature05026
- Mowers, J., Uhm, M., Reilly, S. M., Simon, J., Leto, D., Chiang, S.-H., Chang, L. and Saltiel, A. R. (2013). Inflammation produces catecholamine resistance in obesity via activation of PDE3B by the protein kinases IKK ϵ and TBK1. *Elife* **2**, e01119. doi:10.7554/eLife.01119
- Nithianantharajah, J. and Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 697-709. doi:10.1038/nrn1970
- OECD (2017). Obesity Update 2017. <https://www.oecd.org/health/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85-97. doi:10.1038/nri2921
- Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M. E., Morales, C., Charli, J. L. and Joseph-Bravo, P. (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* **68**, 345-354. doi:10.1159/000054383
- Pettersen, I. K. N., Tusbura, D., Ashrafi, H., Dyrstad, S. E., Hansen, L., Liu, X., Nilsson, L. I. H., Lövsletten, N. G., Berge, K., Wergedahl, H. et al. (2019). Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation. *Mitochondrion* **49**, 97-110. doi:10.1016/j.mito.2019.07.009
- Pradhan, S. (2019). The use of commercially available games for a combined physical and cognitive challenge during exercise for individuals with Parkinson's disease—a case series report. *Physiother. Theory Pract.* **35**, 355-362. doi:10.1080/09593985.2018.1444118
- Prado Lima, M. G., Schmidt, H. L., Garcia, A., Daré, L. R., Carpes, F. P., Izquierdo, I. and Mello-Carpes, P. B. (2018). Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E2403-E2409. doi:10.18653/v1/K18-2014
- Reilly, S. M. and Saltiel, A. R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 633-643. doi:10.1038/nrendo.2017.90
- Reilly, S. M., Hung, C. W., Ahmadian, M., Zhao, P., Keinan, O., Gomez, A. V., DeLuca, J. H., Dadpey, B., Lu, D., Zaid, J. et al. (2020). Catecholamines suppress fatty acid re-esterification and increase oxidation in white adipocytes via STAT3. *Nat. Metab.* **2**, 620-634. doi:10.1038/s42255-020-0217-6
- Remmers, F. and Deleamarre-van de Waal, H. A. (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr. Rev.* **32**, 272-311. doi:10.1210/er.2009-0028
- Rosas-Vargas, H., Martínez-Ezquerro, J. D. and Bienvenu, T. (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch. Med. Res.* **42**, 482-494. doi:10.1016/j.arcmed.2011.09.005
- Rosbergen, I. C. M., Grimley, R. S., Hayward, K. S., Walker, K. C., Rowley, D., Campbell, A. M., McGufficke, S., Robertson, S. T., Trinder, J., Janssen, H. et al. (2017). Embedding an enriched environment in an acute stroke unit increases activity in people with stroke: a controlled before-after pilot study. *Clin. Rehabil.* **31**, 1516-1528. doi:10.1177/0269215517705181
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y., Ko, H. J., Barrett, T., Kim, J. K. and Davis, R. J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* **322**, 1539-1543. doi:10.1126/science.1160794
- 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 Dev.* **24**, 256-264. doi:10.1101/gad.1878510
- Salazar-León, J., Valdez-Hernández, A. L., García-Jiménez, S., Román-Domínguez, L., Huanosta-Murillo, E., Bonifaz, L. C., Pérez-Martínez, L. and Pedraza-Alva, G. (2019). Nlrp1b1 negatively modulates obesity-induced inflammation by promoting IL-18 production. *Sci. Rep.* **9**, 13815. doi:10.1038/s41598-019-49546-7
- Sampedro-Piquero, P. and Begega, A. (2017). Environmental enrichment as a positive behavioral intervention across the lifespan. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 459-470. doi:10.2174/1570159X14666160325115909
- Schmitz, J., Evers, N., Awazawa, M., Nicholls, H. T., Brönneke, H. S., Dietrich, A., Mauer, J., Blüher, M. and Brüning, J. C. (2016). Obesogenic memory can confer long-term increases in adipose tissue but not liver inflammation and insulin resistance after weight loss. *Mol. Metab.* **5**, 328-339. doi:10.1016/j.molmet.2015.12.001
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S. and Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 96-105. doi:10.1172/JCI44271
- Song, Y., Gan, Y., Wang, Q., Meng, Z., Li, G., Shen, Y., Wu, Y., Li, P., Yao, M., Gu, J. et al. (2017). Enriching the housing environment for mice enhances their NK cell antitumor immunity via sympathetic nerve-dependent regulation of NKG2D and CCR5. *Cancer Res.* **77**, 1611-1622. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2143
- 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. *Diabetes* **56**, 2910-2918. doi:10.2337/db07-0767
- 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. doi:10.2337/diacare.17.2.152
- Tonelli, J., Kishore, P., Lee, D. E. and Hawkins, M. (2005). The regulation of glucose effectiveness: How glucose modulates its own production. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **8**, 450-456. doi:10.1097/01.mco.0000172588.47811.63
- Tsai, P.-P., Pachowsky, U., Stelzer, H. D. and Hackbarth, H. (2002). Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab. Anim.* **36**, 411-419.
- 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. *Nat. Med.* **17**, 179-188. doi:10.1038/nm.2279
- Vive, S., Af Geijerstam, J. L., Kuhn, H. G. and Bunketorp-Käll, L. (2020). Enriched, task-specific therapy in the chronic phase after stroke: an exploratory study. *J. Neurol. Phys. Ther.* **44**, 144-155. doi:10.1097/NPT.0000000000000309
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796-1808. doi:10.1172/JCI200319246
- 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. Behav. Immun.* **26**, 500-510. doi:10.1016/j.bbi.2012.01.003
- Woo, C. C. and Leon, M. (2013). Environmental enrichment as an effective treatment for autism: a randomized controlled trial. *Behav. Neurosci.* **127**, 487-497. doi:10.1037/a0033010
- Woo, C. C., Donnelly, J. H., Steinberg-Epstein, R. and Leon, M. (2015). Environmental enrichment as a therapy for autism: a clinical trial replication and extension. *Behav. Neurosci.* **129**, 412-422. doi:10.1037/bne0000068
- Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Slater, A. M., Liu, X., Judd, R. T., Lin, E.-J. D., Widstrom, K. J., Scoville, S. D., Yu, J. et al. (2016). Environmental and genetic activation of hypothalamic BDNF modulates T-cell immunity to exert an anticancer phenotype. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 488-497. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0297
- Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Mansour, A. G., Liu, X., Judd, R. T., Widstrom, K. J., Queen, N. J., Wilkins, R. K., Siu, J. J. et al. (2019). Enriched environment regulates thymocyte development and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Brain. Behav. Immun.* **75**, 137-148. doi:10.1016/j.bbi.2018.09.028
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H. and Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 736-742. doi:10.1038/nn1073
- Yehuda-Shnaidman, E., Buehrer, B., Pi, J., Kumar, N. and Collins, S. (2010). Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis. *Diabetes* **59**, 2474-2483.
- 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* **293**, 1673-1677. doi:10.1126/science.1061620
- 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. *Int. J. Obes. (Lond)*. **31**, 1420-1428. doi:10.1038/sj.ijo.0803632
- 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. doi:10.1016/j.cell.2008.07.043
- Zhao, H., Shang, Q., Pan, Z., Bai, Y., Li, Z., Zhang, H., Zhang, Q., Guo, C., Zhang, L. and Wang, Q. (2018). Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and being in white adipose tissue. *Diabetes* **67**, 235-247. doi:10.2337/db17-0356