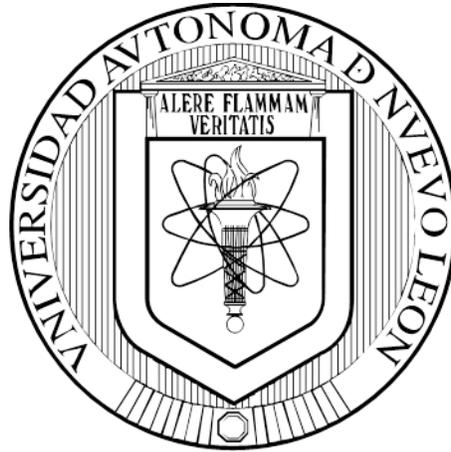


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



Efecto de la programación fetal con dieta calórica sobre la estructura cerebral y sináptica y sobre la conducta similar a depresión en rata

POR

Q.C.B. LUIS ANGEL TRUJILLO VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

JULIO, 2018

Efecto de la programación fetal con dieta calórica sobre la estructura cerebral y sináptica y sobre la conducta similar a depresión en rata

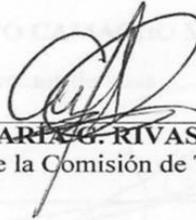
Aprobación de la Tesis:



DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES
Director de Tesis



DR. C. EDUARDO ADRIÁN GARZA VILLARREAL
Co-director de Tesis



DRA. C. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

Efecto de la programación fetal con dieta calórica sobre la estructura cerebral y sináptica y sobre la conducta similar a depresión en rata

Presentado por:

Q.C.B. LUIS ANGEL TRUJILLO VILLARREAL

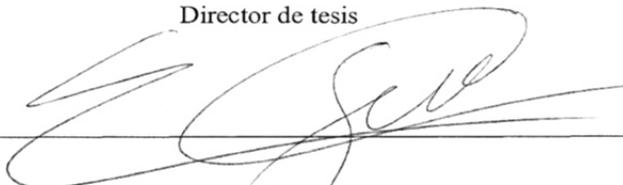
Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina y el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Instituto de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz bajo la Dirección del Dr. en C. Alberto Camacho Morales, la Co-Dirección del Dr. en C. Eduardo Adrián Garza Villarreal y como miembro de la comisión la Dra. En C. Ana María G. Rivas Estilla.

Número de aprobación comité de ética: BI 15-007



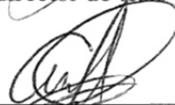
DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de tesis



DR. C. EDUARDO ADRIÁN GARZA VILLARREAL

Co-director de tesis



DR. C. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA

Miembro de la comisión

DEDICATORIA

A mis padres José Luis y Alma, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, a pesar de las diferencias y obstáculos que hemos superado juntos.

A Dinora, por su apoyo incondicional durante todo este arduo camino llamado vida, por tus palabras que me motivan a ser una mejor persona, por compartir alegrías y tristezas, y, sobre todo, por el amor que me has brindado.

A mis hermanos, quienes con su cariño, apoyo y felicidad han sido parte esencial de mi vida.

A la familia Ferrel, por acogerme con su cariño y siempre apoyarme sin importar las circunstancias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a:

Dr. C. Alberto Camacho por aceptarme en su grupo de trabajo, depositar su confianza en mí, tenerme tanta paciencia y estar siempre disponible para cualquier tema.

Dr. C. Eduardo Garza por su tiempo, asesoramiento y apoyo en la realización y análisis de las resonancias.

Dr. C. Luis Concha y M.C. Juan Ortiz por su paciencia, tiempo y capacitación en el uso del resonador.

M.C. Viktor Treviño, por compartir su conocimiento en histología conmigo y apoyar este proyecto.

Dra. Liz y M.C. Nidia Moncada, por su tiempo, amabilidad y disponibilidad.

Mis compañeros del laboratorio Roger, Robbi y Larisa, por su compañía, risas y resolver mis dudas.

Chicos del servicio social Luis Gerardo, Jaime, Shakti, Melissa, Katy y voluntarios Sergio y Pablo, por darme de su tiempo y apoyarme en realizar este trabajo con las mejores actitudes, les deseo lo mejor en su camino.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, la Unidad de Neurociencias del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramon De la Fuente Muñiz.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2	8
ANTECEDENTES	8
2.1 La Obesidad es un grave problema de salud nacional	8
2.2 El incremento en la motivación al consumo de comida calórica es una de las causas del desarrollo de obesidad	10
2.3 Papel del circuito de la recompensa en el proceso de adicción a la comida	11
2.4. Alteraciones microestructurales del cerebro en la conducta de adicción y la depresión-anhedonia	18
2.5 Alteraciones macroestructurales del cerebro en la conducta de adicción y la depresión-anhedonia	22
2.6 La Programación Fetal y su implicación en la modulación de conductas motivantes asociadas a adicción y depresión-anhedonia	29
CAPITULO 3	34
JUSTIFICACIÓN	34
CAPITULO 4	35
HIPÓTESIS	35
CAPITULO 5	36
OBJETIVOS	36
5.1.1 Objetivo General	36
5.1.2 Objetivos Específicos	36
CAPITULO 6	37
MATERIAL Y MÉTODOS	37
6.1 Material de Laboratorio	37
6.2 Estrategia Experimental	39
6.3 Metodología	40
CAPITULO 7	56
RESULTADOS	56
7.1 Pruebas Conductuales	56
7.2 Evaluación de cambios microestructurales por efecto de programación fetal	62

7.3 Evaluación de cambios macroestructurales por efecto de programación fetal	69
CAPITULO 8	75
DISCUSIÓN	75
La programación fetal por dieta CAF fomenta la conducta semejante a anhedonia en la descendencia	76
Programación de alteraciones microestructurales en el cerebro de la descendencia por la exposición materna de dieta calórica	79
Programación de alteraciones macroestructurales en el cerebro de la descendencia por la exposición materna de dieta calórica	82
CAPITULO 9	85
CONCLUSIONES.....	85
CAPITULO 10	86
REFERENCIAS.....	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Déficit del sistema de recompensas implicado en anhedonia	17
Tabla 2. Material biológico y no biológico	37

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AMPA	a-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato
APA	American Psychiatric Association
ASN	Alimentación suprimida novedosa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CA	Campo abierto
CA	Campo abierto
CA1	Cornus Ammonum 1
CA2	Cornus Ammonum 2
CA3	Cornus Ammonum 3
cm	Centímetro
COF	Corteza orbitofrontal
COP	Condicionamiento operante
DA	Dopamina
DAB	Diaminobencidina
FoV	Campo de visión
FR1	Fixed-ratio 1
FR5	Fixed-ratio 5
GD	Giro dentado
h	Hora
HFD	Dieta alta en grasa
Hpp	Hipocampo
Hz	Hertz
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Infralímbica
IMC	Índice de masa corporal

Kcal	Kilo calorías
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
MBD	Morfometría basada en deformación
MCL	Mesocorticolímbico
MG	Materia gris
mg	Miligramos
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
ms	Milisegundos
NAc	Núcleo accumbens
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Prueba alimentación suprimida
PBS	Solución buffer de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PFC	Corteza prefrontal
PL	Prelímbica
PR	Progresive ratio
PS	Preferencia sacarosa
RM	Resonancia Magnética
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar

SYP	Sinaptofisina
T	Tesla
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline tween
TDM	Trastorno depresivo mayor
TE	Tiempo de eco
TR	Tiempo de repetición
v	Volts
VTA	Área tegmental ventral
%PF	Porcentaje preferencia de sacarosa
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

La obesidad materna o la exposición a dietas calóricas durante los períodos pregestacionales y gestacionales promueven alteraciones en el metabolismo de la descendencia a largo plazo. Sin embargo, aunque se conoce, poco se ha estudiado sobre el impacto del consumo excesivo de alimentos calóricos en la salud mental y en los trastornos conductuales relacionados con alteraciones en la motivación por recompensas. En esta tesis probamos la hipótesis de que el consumo de alimento calórico de madres durante el embarazo y lactancia altera la motivación para obtener recompensas naturales en la descendencia, y si estos cambios se correlacionan con alteraciones a nivel de micro y macroestructura cerebral. Empleamos ratas Wistar hembra expuestas a dieta de cafetería (alta en grasa-azúcar) durante 9 semanas que incluye: antes, durante y después del embarazo, protocolo conocido como programación fetal. Analizamos si la programación fetal induce cambios en la motivación para obtener recompensas naturales en descendencia empleando varias pruebas: Condicionamiento Operacional (protocolos FR1, FR5 y PR en la caja de Skinner), preferencia a sacarosa, campo abierto y alimentación suprimida. Las alteraciones macro y microestructurales se analizaron por Morfometría basada en la Deformación por Imágenes de Resonancia Magnética y por Western blot e inmunohistoquímica (marcadores receptores NMDA y AMPA y sinaptofisina), respectivamente. Los resultados indican que la descendencia de madres expuestas a programación fetal obtuvo menor motivación para obtener recompensas naturales, evidenciada por decremento en los protocolos FR1, FR5 y PR. Además, la descendencia también mostró decremento en la preferencia a sacarosa y mayor tiempo en la prueba de alimentación suprimida, indicativos de decremento en motivación semejante a la anhedonia. Los análisis macroestructurales empleando imagen de resonancia magnética mostraron cambios en el volumen de diversas regiones del sistema mesocorticolímbico que incluyen al estriado, hipocampo y corteza. Por su parte, los análisis microestructurales revelan cambios anatómicos en las regiones de hipocampo y núcleo accumbens. Lo anterior se correlaciona con una disminución en los marcadores

de NMDA y receptores de sinaptofisina. Nuestros hallazgos revelan que la programación por dieta calórica reduce la motivación por recompensas naturales, que correlaciona con cambios a nivel macro y microestructural de regiones del circuito mesocorticolímbico.

ABSTRACT

Maternal obesity or exposure to caloric diets during the pre-gestational and gestational periods promotes long term alterations in the offspring metabolism. However, the impact of excessive consumption of caloric foods on mental health and behavioral disorders related to alterations in reward motivation has not been identified. Here, we tested the hypothesis that caloric food consumption in mothers during pregnancy and lactation alters motivation to obtain natural rewards in the offspring, and if these changes correlates with micro and macrostructure alterations in brain. We use female Wistar rats exposed to a cafeteria diet (high in fat-sugar) for 9 weeks including: before, during and after pregnancy, a protocol known as fetal programming. We analyzed if fetal programming induces changes in motivation to obtain natural rewards addressing several tests: Operational Conditioning (FR1, FR5 and PR protocols in Skinner box), preference to sucrose, open field and suppressed feeding. Macro and microstructural alterations were analyzed by Morphometry based on Magnetic Resonance Imaging and by Western blot and immunohistochemistry (NMDA and AMPA receptor markers and synaptophysin), respectively. Our results indicate that the offspring of mothers exposed to fetal programming obtained less motivation to obtain natural rewards, evidenced by a decrease in the FR1, FR5 and PR protocols. In addition, offspring also showed a decrease in sucrose preference and a longer time spent in the suppressed feeding test, evidenced a decrease in motivation such as anhedonia. Macrostructural analysis using magnetic resonance imaging showed changes in mesocorticolimbic system volume including the striatum, hippocampus and cortex. On the other hand, microstructural analysis reveals anatomical changes in the hippocampal and nucleus accumbens regions. The later correlates with a decrease in NMDA markers and synaptophysin receptors.

Our findings reveal that caloric diet programming reduces motivation for natural rewards, which correlates with macro and microstructural changes in the mesocorticolimbic circuit.



Dr.C. Alberto Camacho Morales

Director de Tesis

CAPÍTULO 1

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una condición patológica que se asocia al desarrollo del desbalance energético en donde la ingesta de calorías excede las calorías que se consumen en forma de energía con la finalidad de mantener las condiciones basales del organismo (Torres and Nowson 2007). Estudios epidemiológicos han mostrada evidencia contundente del papel del medio ambiente como un inductor de alteraciones metabólicas y de la conducta de los individuos. Se sabe que los estímulos externos son capaces de incidir durante el desarrollo embrionario, que incluye a los periodos pre- y postnatales, y manifestarse en un amplio rango de psicopatologías, que inclusive pueden preservarse hasta la etapa adulta (Ahmed et al. 2010; Barazzoni et al. 2015; Breier et al. 2001; Chang et al. 2008; Gueye et al. 2018; Vickers et al. 2000). En particular, el consumo de alimentos ricos en grasas saturadas, azúcar y bajos en fibra, presente en las sociedades modernas y al decremento de la actividad física, la ausencia de sueño y el estrés, pueden ser algunos detonantes que inciden en el desarrollo de estas patologías (Popkin & Gordon-Larsen, 2004). En este contexto, se ha propuesto actualmente que la nutrición de los padres puede tener efectos transgeneracionales que modulan el incremento o prevención del desarrollo de obesidad y trastornos del comportamiento (Aiken & Ozanne, 2014). Datos recientes indican que mujeres obesas, o bien, mujeres embarazadas que incrementan el consumo de alimento calórico, inducen de manera colateral el aumento del aporte

energético en el útero y durante el desarrollo postnatal temprano, un proceso conocido como programación fetal. La programación fetal se refiere al proceso mediante el cual la exposición a estímulos ambientales o externos durante los períodos críticos de desarrollo conduce a cambios permanentes en la fisiología del organismo, cuyas consecuencias son inclusive observadas en etapas tardías de la vida (Peleg-Raibstein, Luca, and Wolfrum 2012). Los mecanismos, por los cuales la obesidad materna y el exceso de nutrientes en el útero promueven un mayor riesgo de futuros trastornos psiquiátricos, son poco conocidos, pero probablemente incluyen cambios en el suministro de nutrientes fetales en combinación con mecanismos genéticos y epigenéticos (Heerwagen et al. 2010). Aunque pocos estudios han explorado este tema, los datos clínicos y de modelos animales sugieren que, además de alteraciones metabólicas, la obesidad materna podría estar asociada con una función cognitiva deficiente y de comportamiento en la descendencia, como se menciona a continuación.

Estudios en humanos y en modelos animales han demostrado que la ingesta de dieta calórica en periodos críticos del desarrollo embrionario fomenta la aparición de conductas aberrantes en la descendencia semejantes a la anhedonia (Gueye et al. 2018; Peleg-Raibstein, Luca, and Wolfrum 2012; Sullivan, Nousen, and Chamlou 2013). La anhedonia, o pérdida de interés o placer, es un síntoma característico de muchos trastornos neuropsiquiátricos, principalmente el trastorno depresivo mayor (TDM) y la esquizofrenia (Der-Avakian and Markou 2012). Durante la anhedonia se presenta déficit del sistema de la recompensa, en donde existe un decremento en la motivación para buscar experiencias placenteras y la falta de decisiones apropiadas para un fin. En la mayoría de los casos, la presencia de anhedonia es un punto de inicio para el desarrollo

de depresión, sin embargo, la anhedonia también se encuentra incluida en la lista de síntomas de otros trastornos como en esquizofrenia, en gran parte debido a que la depresión, la anhedonia y la esquizofrenia comparten circuitos de activación cerebral (Lambert et al. 2018). Como ejemplo, el diagnóstico de TDM se caracteriza por la presencia de al menos cinco de nueve criterios, de los cuales la anhedonia es un criterio central de diagnóstico (APA 2013). Los análogos preclínicos de estas escalas de anhedonia y los procedimientos más comúnmente utilizados para evaluar el comportamiento similar a la depresión en roedores son las pruebas de ingesta y preferencia de sacarosa, en las que disminuye la ingesta o la preferencia de una solución de sacarosa dulce (en relación con el agua) refleja un estado anhedónico (Der-Avakian and Markou 2012). Como resultado, hay más de 200 combinaciones de criterios potenciales que pueden cumplir un diagnóstico. En este contexto, los pacientes con TDM que presentan síntomas anhedónicos pueden demostrar disociación entre el placer vivido y la motivación, la expectativa de resultados negativos independientemente de los resultados positivos previos y una mayor prevención del riesgo a desarrollarlos (Lambert et al. 2018). Por su parte, también se ha identificado que la anhedonia es un síntoma residual prominente después del tratamiento. Según la American Psychiatric Association (APA 2013), los trastornos mentales de mayor prevalencia son los del estado de ánimo depresivo y los de ansiedad; la depresión se ha reportado con valores del 10 % al 25 % para las mujeres y del 5 % al 12 % para los hombres, y la ansiedad con porcentajes entre el 3 % al 5 % de la población general. En México, el 29.9 % de integrantes del hogar de 12 años y más, han tenido episodios con sentimientos de depresión. Además, de estos integrantes, 10.5 % lo presenta diariamente, 12.4 % semanalmente, 11.6 % mensualmente y un 65.5% anualmente (INEGI 2015). En este concepto, la depresión en

la población mundial se ubica en más de 300 millones de personas afectadas con mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres. Especialmente cuando es de larga duración y con intensidad moderada o severa, la depresión puede convertirse en una condición de salud seria que puede llevar al suicidio. De hecho, se estima que alrededor de 800 000 personas mueren debido al suicidio cada año, siendo la principal causa de muerte en personas de 15 a 29 años (WHO 2018). Además, puede ser causa de enfermedades letales tales como enfermedades cardíacas, trastornos cerebrovasculares, y otras causas de mortalidad (Duman, Aghajanian, and Krystal 2016). Dada la alta prevalencia de estos trastornos en la población general y la disminución de la esperanza de vida de 7-20 años asociada a ellos (Pasternak et al. 2018), existe una necesidad crítica de desarrollar estudios y tratamientos más eficaces basados en neurobiología, aunque esto depende de una comprensión e investigación de la función del cerebro en estos trastornos.

Existen numerosos estudios publicados que documentan los cambios neurobiológicos asociados con TDM, esquizofrenia y otros trastornos neuropsiquiátricos caracterizados por anhedonia, pero relativamente pocos que abordan específicamente la presencia o severidad de anhedonia. Considerando que el TDM y la esquizofrenia se caracterizan por diversos síntomas o criterios de diagnóstico, es poco probable que los circuitos neuronales que median la anhedonia también estén implicados, por ejemplo, en alucinaciones o sentimientos de culpa o castigo. Por lo tanto, es un gran reto el identificar y vincular los mecanismos genéticos y neuronales individuales de cada sujeto a trastornos conductuales tan complejos. Sin embargo, lo que sí está claro es que a nivel molecular, el desarrollo de la anhedonia involucra defectos en los mecanismos

moleculares de regiones del sistema nervioso que se involucran durante el comportamiento de búsqueda de recompensa, las cuales incluyen la corteza prefrontal medial (mPFC), el área tegmental ventral y el núcleo accumbens (NAc) (Koob and Volkow 2016; Uys and Reissner 2011), también llamado circuito mesocorticolímbico o “circuito de la recompensa”(Kenny and Shaw 2011; Koob and Volkow 2016). Dicho circuito es también parte de la regulación del evento adictivo a recompensas naturales y no naturales. En este sentido, los estudios en animales y las imágenes obtenidas de humanos con adicción a las drogas, concluyen que la adicción representa una desregulación dramática de los circuitos motivacionales que se asocia al incremento en la preferencia de estímulos recompensantes, formación de hábitos, exceso de estrés, y una función ejecutiva comprometida (Koob and Volkow 2016). En su conjunto, la neurobiología de la adicción, como se define generalmente en poblaciones clínicas, puede corresponder a la neurobiología no solo de la anhedonia, sino también de otros procesos discretos relacionados con la recompensa.

El desarrollo de un fenotipo de anhedonia y/o adicción, implica el remodelamiento del sistema nervioso a través de un proceso conocido como plasticidad cerebral a nivel macro y microestructural. El hipocampo juega un papel importante en múltiples procesos cognitivos, particularmente la memoria declarativa. Su compromiso estructural es un sello distintivo de los trastornos psiquiátricos, como la depresión (Y. Li et al. 2017; Macedo et al. 2015). Recientes estudios de metaanálisis integrando imágenes estructurales a nivel clínico han detectado cambios volumétricos en varias regiones del cerebro en TDM en relación con los controles (Schmaal et al. 2016). Dentro de ellos, algunos estudios han revelado una disminución del volumen en hipocampo de modelos

de rata de depresión utilizando la técnica de resonancia magnética (RM) (Gigliucci et al. 2014). Adicionalmente, estudios de Espectroscopia de Resonancia Magnética (ERM) a menudo han reportado una reducción de glutamato, el neurotransmisor excitatorio más común, en la corteza prefrontal de TDM en comparación con los controles (Miladinovic, Nashed, and Singh 2015). Por su parte, empleando modelos en ratas se han identificado la presencia de alteraciones microestructurales que se asocian a la disminución de tamaño y número celular en la región CA1, una capa más delgada de células y desorganización en el arreglo celular en ratas con depresión inducidas por estrés (Y. Li et al. 2017; Macedo et al. 2015), lo cual es consistente con sus resultados de resonancia magnética nuclear. Además, durante el establecimiento del fenotipo adictivo se conoce que se presentan cambios en la plasticidad sináptica de las vías de señalización glutamatérgica, incluidos los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), receptores de glutamato metabotrópicos, de la dopamina y del sistema opioide (Russo and Nestler 2013; Scofield et al. 2016) (Camacho et al. 2017). En particular, los eferentes glutamatérgicos transmiten información al NAc, que recibe las entradas dopaminérgica y glutamatérgica del VTA y la amígdala, respectivamente; en donde su principal función es proveer el valor incentivo y aumento de la motivación para una acción dirigida al objetivo planificada a nivel de la PFC (Koob and Volkow 2016). Finalmente, se desconoce a la fecha los mecanismos celulares que subyacen a la plasticidad macroestructural en el cerebro humano y la relación entre anomalías estructurales y mecanismos de la depresión, en parte por la incapacidad tecnológica y por limitaciones éticas para lo que se requerirían tejidos post-mortem o biopsia cerebrales (Gaser et al. 2012; Thanos et al. 2016).

Con base en que la programación fetal por ingesta de dieta calórica durante periodos críticos del desarrollo embrionario fomenta la aparición de conductas aberrantes en la descendencia, que incluyen deficiencias en el sistema glutamatérgico en el NAc y la PFC (Camacho et al. 2017). En este trabajo de tesis se identificó en un modelo animal si la descendencia de madres sometidas a programación nutricional muestra conducta similar a la depresión, que correlacione con alteraciones en la plasticidad macro y microestructural a nivel de sinapsis de glutamato.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 La Obesidad es un grave problema de salud nacional

La obesidad representa un problema médico importante en todo el mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se clasifica de acuerdo con el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). En esta escala una persona que presente un índice de masa corporal (IMC) superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ se clasifica como obeso, mientras que el sobrepeso se incluye en $28\text{-}30 \text{ kg}/\text{m}^2$ y un individuo de talla normal presenta menos de $28 \text{ kg}/\text{m}^2$ (Figura. 1) (OMS, 2016).

a)
$$\frac{\text{Peso}}{(\text{Talla})^2} = \text{IMC}$$

b)



Figura 1. Representación del desarrollo de obesidad conforme avanza el IMC. A) Ecuación del cálculo del IMC, B) Clasificación de pacientes con sobrepeso y con obesidad de acuerdo con su IMC.

Estadísticas epidemiológicas muestran que la obesidad ha incrementado exponencialmente en los últimos 30 años en todo el mundo; sin embargo, algunos países muestran mayor incremento respecto a otros. Por ejemplo, en el 2015 la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) reportó en el 2017, que el 19,5% de la población adulta era obesa (OECD, 2017). En específico, durante el último decenio, la tasa de prevalencia de sobrepeso y obesidad ha aumentado en Canadá, Francia, México, Suiza y Estados Unidos, en donde México se ubica como el primer país con obesidad en niños y el segundo con obesidad en adultos (OECD 2017). Por otro lado, las tasas de obesidad se han estabilizado en Inglaterra, Italia, Corea y España. No hay, sin embargo, a la fecha no hay evidencia que demuestre reducción del porcentaje de obesidad en ningún país del mundo (OECD 2017).

Adicional a representar un problema estético debido a la acumulación de tejido adiposo en el cuerpo, la obesidad incrementa el desarrollo de diversas patologías en la salud que incluyen, la hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, el infarto cerebral, enfermedad de hígado graso no alcohólico, depresión, síndrome de ovario poliquístico y aterosclerosis enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, enfermedades musculoesquelético y algunos tipos de cánceres (Niero et al. 2017; Oestreich and Moley 2017).

Entender el origen del desarrollo de obesidad es complicado, por lo que se propone que su presencia obedece a la integración de vías multifactoriales de activación que incluye, la genética, estilos de vida, además de influencia de diversos determinantes subyacentes, como la globalización, la cultura, la condición económica, la educación, la urbanización y el entorno político y social (Cecchini et al. 2010; Oestreich and Moley

2017). Recientemente, se ha propuesto que el incremento en la motivación por consumir alimentos de naturaleza calórica puede representar una conducta adictiva que define una de las causas del desarrollo de obesidad en nuestra población (Camacho et al. 2017; Peleg-Raibstein, Luca, and Wolfrum 2012), lo cual describiremos en la siguiente sección.

2.2 El incremento en la motivación al consumo de comida calórica es una de las causas del desarrollo de obesidad

Aspectos psicológicos han sido asociados a los distintos tipos de trastornos de alimentación. La obesidad en particular ha sido vinculada a aspectos depresivos, ansiosos, impulsivos y pasivos del carácter vinculados a carencias afectivas (Webber 2004). Dentro de los factores psicológicos se ha estudiado la baja autoestima y la alteración en la auto-percepción de la imagen corporal (Coelho et al. 2013; Goldner and Levi 2014; Isnard et al. 2003; Schwartz and Brownell 2004) De hecho, la obesidad se considera un factor de riesgo para los trastornos del estado de ánimo, incluida la depresión. De forma más global, los metaanálisis recientes han confirmado la relación bidireccional entre las dos patologías (AN PAN 2012; Faith et al. 2011).

La similitud de los procesos cerebrales que se activan durante la exposición aguda de las drogas y a los alimentos sugiere la posibilidad de la existencia de una afección del circuito de la recompensa mediada por la dieta (Hsu et al. 2017). Por lo tanto, el entendimiento y los procesos fisiológicos y moleculares que participan en los procesos de adicción a la comida es esencial para comprender y resolver el problema de la obesidad; sin embargo, el mecanismo responsable de los comportamientos aberrantes

a causa de la dieta no han sido estudiados de manera exhaustiva. Recientemente, se han identificados mecanismos comparables entre el consumo de alimentos ricos en energía y el comportamiento compulsivo relacionado con la ingesta de drogas de abuso. Lo anterior es plausible con base en las propiedades intrínsecamente gratificantes de ambos estimulantes, a pesar, por su parte, de las necesidades energéticas requeridas por el consumo de comida (Sarker et al. 2016). Por ejemplo, los alimentos de sabor con bajo contenido calórico no se consumen en exceso, mientras que los alimentos apetecibles a menudo se consumen incluso después de que se hayan cumplido los requisitos de energía (Koob and Volkow 2016). Debido a las diversas similitudes entre comer en exceso en la obesidad y el uso excesivo de drogas en la adicción, se ha argumentado que el comer en exceso durante la obesidad puede bien ubicarse en la clasificación de una conducta de adicción (Koob and Volkow 2016; Sarker et al. 2016).

2.3 Papel del circuito de la recompensa en el proceso de adicción a la comida

La adicción es un desorden neuropsiquiátrico debilitante crónico en donde se busca motiva al individuo para la búsqueda de la recompensa que puede incluir sustancias de abuso, comida, videojuegos, pornografía, etc., Cuando se habla de adicción, en la mayoría de los casos hace referencia al consumo de drogas, en donde la enfermedad representa una gran carga para el individuo y la sociedad (Montoya 2008). Los agentes adictivos inducen cambios adaptativos en la función cerebral; estos cambios son las bases para la tolerancia y para el establecimiento de la ansiedad, el retiro y la percepción afectiva, que persisten mucho después de que el consumo cesa. Esta

neurobiología auto sostenible y progresiva de las adicciones las convierte en trastornos crónicos y recurrentes difíciles de controlar (Goldman, Oroszi, and Ducci 2005).

El desarrollo de un evento adictivo durante el procesamiento de recompensas incluye de manera esencial, el interés en algo que el individuo considera placentero o recompensante (Koob and Volkow 2016). La anticipación de este placer generalmente se sigue seguido de un aumento en la motivación para formular un plan apropiado para obtener la recompensa, seguido por el gasto de un esfuerzo adecuado para lograr el resultado deseado (Kring and Barch 2015). El placer consumado pasado y el aprendizaje de la recompensa sirven para modular la toma de decisiones y el placer futuros con respecto a un estímulo específico (Figura 2), donde juegan un papel importante la comunicación entre PFC, NAc e hipocampo, mediante sistema glutamatérgico (Uys and Reissner 2011). El aprendizaje de recompensas, la integración de retroalimentación y la predicción correcta de la magnitud de la recompensa también juegan un papel importante en el control de la conducta dirigida a los objetivos (Lambert et al. 2018).

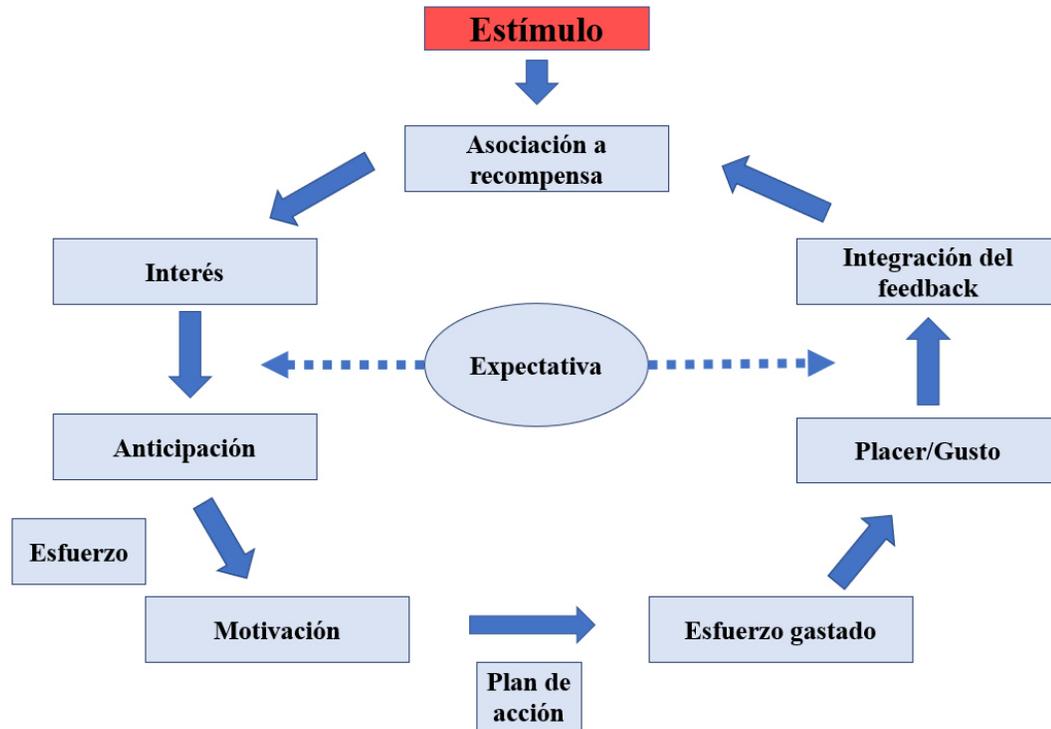


Figura 2. Un esquema simple que destaca los aspectos clave del procesamiento de recompensas. Dentro de ello, se ilustra las partes del proceso de obtención de una recompensa, para esto, se requiere que exista un interés por obtener el estímulo. Al despertar el interés por la recompensa, empieza el razonamiento del costo expresado en esfuerzo, para obtener el estímulo, en este punto es cuando se desarrolla una motivación para adquirir el estímulo. Si se desarrolla una motivación suficiente como para realizar un esfuerzo, el placer/gusto por el estímulo empieza a jugar un papel importante en el proceso de obtención de recompensa. Al tener un efecto positivo en el placer, esto mediado principalmente en NAc, empieza a desarrollarse una comunicación entre todo el circuito de la recompensa, incluyendo el hipocampo que permite la asociación y memoria del estímulo, creando así mayor facilidad para repetir el ciclo, aumentando la motivación por obtener la recompensa. Las deficiencias en cualquier parte del circuito pueden dar como resultado la presentación de anhedonia. (Modificado de Kring and Barch, 2014).

Gran parte del avance en las bases neurobiológicas de la adicción se ha desarrollado con la investigación en los procesos dependientes de adicción a las drogas empleando en su mayoría modelos animales y su confirmación en estudios de imagen cerebral en humanos. Se conoce que las drogas adictivas median sus propiedades de refuerzo dirigidas al sistema mesocorticolímbico también conocido como “circuito de la recompensa”, el cual está formada por el VTA y sus blancos principales, que incluyen el

NAc y la PFC, (Figura 3)(Koob and Volkow 2016; Lu 2011). El desarrollo del evento adictivo sigue una serie de etapas, que inicia desde el uso social hasta promover períodos de recaída regulada y, en última instancia, comportamientos compulsivos de búsqueda de drogas característicos de la adicción (Uys and Reissner 2011). Las adaptaciones dentro del neurocircuito involucradas en el proceso de adicción siguen vagamente estas etapas. Por ejemplo, la exposición aguda a drogas de abuso involucra como acción principal que incluye, el incremento de la dopamina (DA) desde el VTA hasta sus blancos descritos a través del circuito mesolímbico del cerebro, incluyendo la corteza prefrontal (PFC), amígdala, hipocampo y particularmente el NAc (Koob and Volkow 2016). Cada una de estas estructuras y circuitos relacionados están asociadas con contribuciones específicas al comportamiento y las etapas de la adicción.

Desde el punto de vista de neurotransmisión, adicional a la señalización dopaminérgica en las estructuras mesolímbicas del cerebro, con el tiempo y con la exposición crónica, se involucra la transmisión glutamatérgica y GABAérgica. De hecho, las proyecciones glutamatérgicas clave se envían desde la PFC y el hipocampo (Koob and Volkow 2016), (Figura 3 y 4). Por otro lado, las proyecciones al NAc de la PFC en rata se pueden subdividir en aferentes que surgen de las cortezas prelimbicas (PL) e infralímbica (IL); la proyección desde PL al núcleo NAc representa una vía de "ir" que media la búsqueda de drogas, mientras que la proyección del IL al NAc representa una vía "parada" que inhibe la búsqueda de drogas. Estas dos vías paralelas pueden representar un sistema de señales conflictivas que en su momento y ciertas condiciones rigen el control de las conductas relacionadas con la recaída (Russo and Nestler 2013; Uys and Reissner 2011).

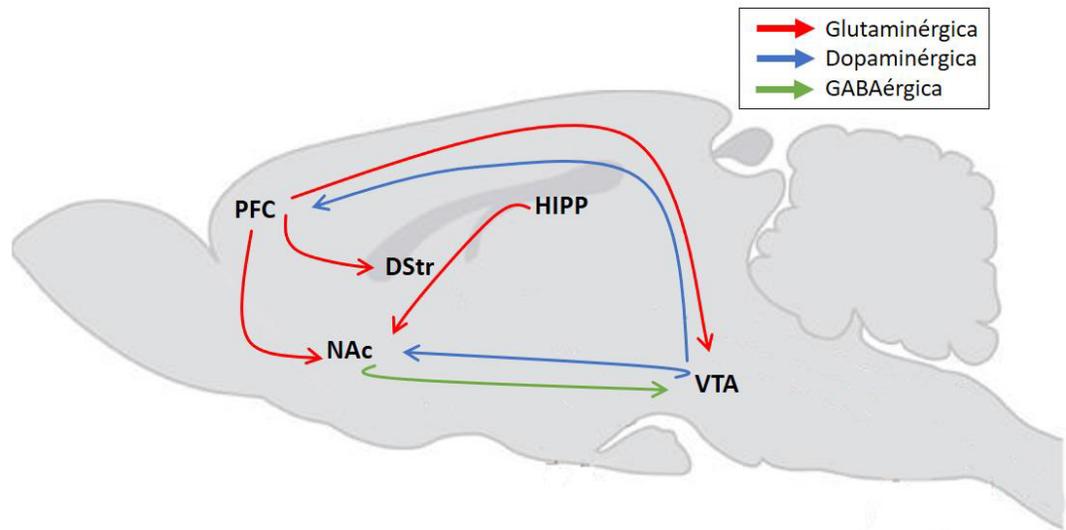


Figura 3. Representación básica del neurocircuito de la adicción en el cerebro de ratas. Se representan las estructuras cerebrales integrales a los comportamientos relacionados con las drogas se, en la disposición topográfica general, ya que se encuentran en el cerebro de la rata. Las proyecciones dopaminérgicas se representan con flechas rellenas azules, mientras que las proyecciones glutamatergicas se representan con flechas rojas. La flecha verde de NAc a VTA indica la proyección GABAérgica. La exposición aguda a drogas de abuso conduce a una señalización dopaminérgica excesiva, particularmente dentro de PFC, NAc, e HIPP. Con el tiempo, la transmisión glutamatergica desde y dentro de estas estructuras se ve afectada. VTA, área tegmental ventral; PFC, corteza prefrontal; HIPP, hipocampo; NAc, núcleo accumbens; DStr, estriado dorsal. (Koob and Volkow 2016; Uys and Reissner 2011).

Investigaciones en humanos empleando neuroimagen cerebral ha confirmado la evidencia documentada en modelos animales mostrando que drogadictos exhiben diferencias en una gran variedad de tareas cognitivas y motivacionales, revelando patrones de actividad cerebral selectivas que incluyen regiones de la corteza prefrontal, áreas que reciben proyecciones corticales prefrontales, como la amígdala, áreas límbicas de los ganglios basales (NAc)) y el VTA rica en dopamina (Figura 4) (Kalivas and Volkow 2008; Koob and Volkow 2016). Además, la actividad en la corteza insular y el cerebelo a menudo se activa en condiciones de anhelo a las drogas (Bade et al. 2017; Thanos et al. 2016).

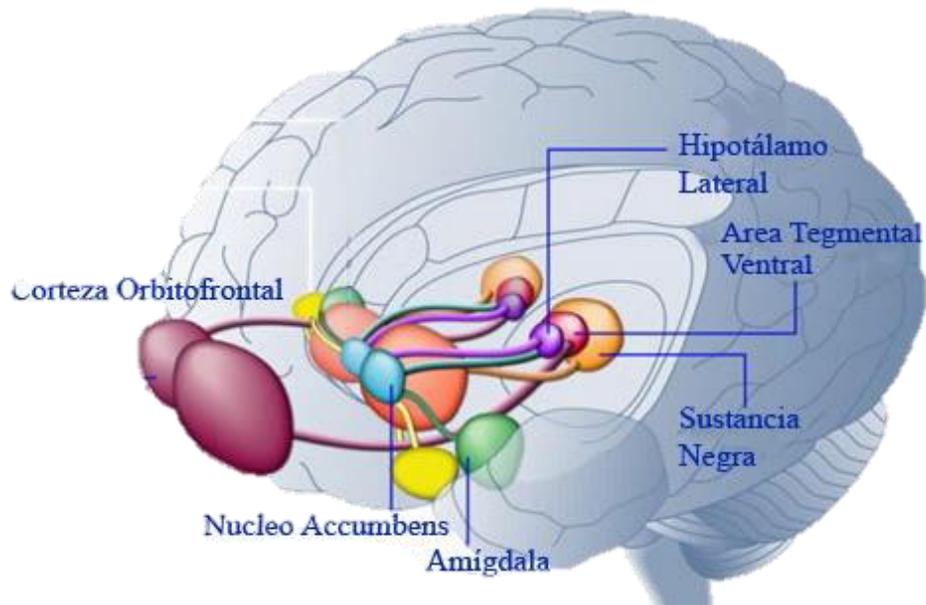


Figura 4. Representación básica de las áreas del cerebro humano activadas en respuesta a alimentos apetecibles. En la imagen, la corteza orbitofrontal y la amígdala codifican información relacionada con el valor de recompensa de los alimentos, mientras que en la ínsula (punto en que confluyen los lóbulos temporal, parietal y frontal) procesa información relacionada con el sabor de los alimentos y su valoración hedónica. El NAc y el cuerpo estriado dorsal, que reciben aportes dopaminérgicos del VTA y de la sustancia negra, regulan las propiedades de motivación e incentivo de los alimentos. El hipotálamo lateral puede regular las respuestas gratificantes a los alimentos sabrosos y conducir conductas de búsqueda de alimentos. Estas estructuras cerebrales actúan de forma concertada para regular el aprendizaje sobre las propiedades hedónicas de los alimentos, desplazando la atención y el esfuerzo hacia la obtención de recompensas alimentarias y regulando el valor incentivo de los estímulos ambientales que predicen la disponibilidad de recompensas alimenticias. Nótese que las regiones que componen el circuito mesocorticolímbico en humanos, son semejantes a las existentes en modelos de rata (Modificado de Kenny, P.2011).

De interés, los circuitos neuronales implicados en el desarrollo de adicción, también están presentes en otros trastornos neuropsiquiátricos que se caracterizan en parte por estados motivacionales desadaptativos, que incluyen anhedonia, la depresión, la manía y el trastorno de estrés postraumático, un hecho que apunta a fenotipos compartidos entre enfermedades, como la impulsividad, la percepción deficiente y la toma de decisiones deteriorada (Becker et al. 2017; Hopkins 2014; Lambert et al. 2018).

Aunque parezca es probable que los mecanismos moleculares subyacentes que contribuyen a estas enfermedades sean distintos, la aparente superposición en fenotipos refleja las deficiencias en la capacidad de los sujetos afectados para modular o revertir los circuitos cerebrales, que en muchas circunstancias se activan hacia la regulación homeostática de las funciones cognitivas y emocionales, y en la ejecución de respuestas conductuales adaptativas. Las definiciones tradicionales han enfatizado el aspecto consumatorio de anhedonia; sin embargo, un déficit en cualquier aspecto del sistema de recompensa (ver Tabla 1) podría potencialmente impedir que un individuo llegue a la etapa de placer consumatorio y por lo tanto presente como una incapacidad para sentir placer. Es importante destacar que el procesamiento de recompensa no es necesariamente lineal cuando uno la faceta sigue a la otra, y en su lugar, las facetas pueden ocurrir en paralelo (por ejemplo, el interés en sí mismo puede resultar en placer consumatorio) (Kring and Barch 2015). En cualquier caso, esto sugiere que puede haber mecanismos neurobiológicos diferenciales subyacentes a la presentación clínica de la anhedonia.

Tabla 1. Déficit del sistema de recompensas implicado en anhedonia. Numerosos reportes en la literatura indican diferente déficit dentro de un proceso de obtención de recompensa en el padecimiento o establecimiento de comportamientos depresivos, sin embargo, estos déficits no son exclusivos de un solo comportamiento, pues se han observado de igual manera en pacientes de esquizofrenia. Por lo que existen circuitos que convergen entre sí, que, al dañarse mediante algún estrés de cualquier tipo, dan pauta a ser susceptibles a desordenes psiquiátricos.

Déficit	Depresión	Referencia
Motivación	Disminuida	Sherdell et al 2012
Placer anticipatorio	Disminuido	Liu et al 2011
Aprendizaje recompensante e integración	Disminuido	Kumar et al 2008
Error en predicción	Señalización disminuido en Nac y mesencéfalo	Gradin et al 2011
Placer consumado	Medianamente disminuido	Da Silva et al 2011

Así, existe una alta comorbilidad entre la adicción y otras enfermedades neuropsiquiátricas, que incluyen la afección del mismo circuito cerebral para disminuir o aumentar el fenotipo conductual, incluyendo la anhedonia (Bai et al. 2014; Der-Avakian and Markou 2012). Los correlativos de dichos circuitos que involucran alteraciones micro y macroestructurales en el desarrollo de conductas selectivas los describiremos a continuación.

2.4. Alteraciones microestructurales del cerebro en la conducta de adicción y la depresión-anhedonia

Aunque, se desconocen aún los mecanismos moleculares precisos que subyacen al vínculo entre la activación de un circuito cerebral selectivo para disminuir o aumentar un fenotipo conductual, se ha identificado la existencia de alteraciones a nivel microestructural comúnmente denominadas plasticidad sináptica. La plasticidad sináptica se refiere a la capacidad de las sinapsis para conectarse de manera más fuerte o más débil en respuesta a un estímulo específico, existe evidencia considerable de que estos mecanismos se ven afectados después de la exposición a drogas de abuso (Uys and Reissner 2011). Durante los procesos de plasticidad sináptica mejor caracterizados se encuentra la plasticidad sináptica del glutamato. La neurotransmisión glutamatérgica integra las vías de señalización que incluyen a los receptores amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y los receptores de glutamato metabotrópico (Russo and Nestler 2013; Scofield et al. 2016). La fuerza sináptica puede controlarse presinápticamente regulando la liberación de glutamato y postsinápticamente mediante la inserción o eliminación del AMPA o

receptores de glutamato NMDA (Kalivas and Volkow 2008). Considerando el papel generalizado del glutamato en importantes procesos centrales y periféricos, no es de sorprender que la liberación, captación, metabolismo y señalización del glutamato sean procesos estrechamente regulados. Por ejemplo, la desregulación del glutamato se ha identificado en ciertos trastornos psiquiátricos, del neurodesarrollo y neurodegenerativos, como la esquizofrenia, el síndrome X frágil y la epilepsia (Miladinovic, Nashed, and Singh 2015). Para el caso de su papel en el desarrollo de adicción, existen cambios duraderos en la plasticidad sináptica observados en el NAc después de la exposición crónica y después de largos períodos de abstinencia del uso de cocaína (Figura 5). Por ejemplo, posterior a una administración crónica de cocaína, las sinapsis en el NAc muestran depresión rápida de la fuerza sináptica (Uys and Reissner 2011). Sin embargo, al presentar 24 h de abstinencia se observa una menor expresión de los receptores AMPA en la superficie celular, que correlaciona con la disminución en la fuerza sináptica causado por la internalización de este receptor y el aumento del receptor NMDA (Hussain et al. 2016; Scofield et al. 2016). El incremento en la fuerza sináptica se asocian con una mayor expresión de la superficie de los receptores AMPA (Chaki 2017; Hussain et al. 2016; Uys and Reissner 2011). A nivel estructural, los receptores AMPA existen como homo- o heterotetrámeros, más a menudo compuestos de conjuntos de dos subunidades (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4). A lo largo del proceso de abstinencia (2 a 4 semanas) en una exposición crónica previa, comienza la movilización de receptores AMPA hacia la superficie, y con ella efectos sobre el tamaño del cuerpo celular y el tamaño y la densidad de la espina (Kalivas and Volkow 2008; Uys and Reissner 2011), y con esto la potenciación de la sinapsis. Sin embargo, durante la fase de recaída a la droga, el balance homeostático entre los receptores NMDA y AMPA no se

recupera, sino que existe un decremento en la transmisión sináptica de glutamato con un aumento de expresión del receptor NMDA en la superficie de la espina postsináptica (Huang and Dong 2016; Koob and Volkow 2016). Se propone que, en estas condiciones, se motiva la búsqueda de la recompensa con la finalidad de incrementar la deficiencia de la transmisión glutamatérgica dependiente del NMDA.

En su conjunto, es de notarse que los comportamientos relacionados con la adicción se han relacionado con deficiencias en el sistema glutamatérgico en el NAc y la PFC. Con ello, la modulación de los receptores NMDA y AMPA han sido propuestos como blancos prometedores para el tratamiento de trastornos adictivos, y podrían potencialmente ser también blancos para los eventos de adicción a la comida (Camacho et al. 2017).

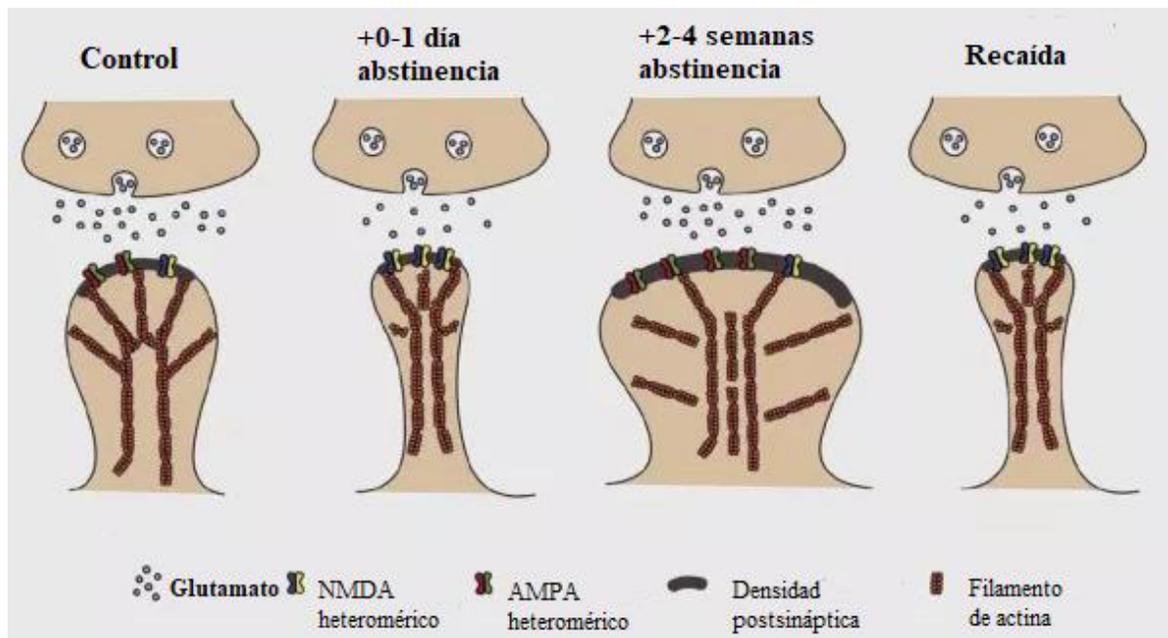


Figura 5. Plasticidad sináptica inducida por exposición crónica de cocaína en el NAc de ratas. La exposición crónica de cocaína induce cambios en las concentraciones de glutamato extracelular y en la transmisión glutamatérgica sináptica en el NAc de ratas. Esta exposición, estimula la señalización glutamatérgica en las estructuras mesolímbicas del cerebro y remodela la estructura sináptica mediante el

intercambio de receptores donde en primera instancia predomina el receptor NMDA, ocasionando una disminución en la fuerza sináptica. Sin embargo, cuando existe un período de abstinencia, este intercambio se invierte, predominando el receptor AMPA, con un subsecuente aumento en la transmisión sináptica del glutamato. Cabe destacar que, durante cada etapa de este proceso, ocurren, además, cambios morfométricos de la estructura celular de la espina, la cual, de igual manera, regula la fuerza de la sinapsis. Sin embargo, esta movilización no se revierte al estado inicial (control), por lo que está involucrado en la búsqueda y obtención del estímulo (Modificado de Cobbers on the brain), (Cobersonthebrain n.d.)

Como comentamos anteriormente, el circuito mesocorticolímbico que se asocia a la modulación del desarrollo de la conducta adictiva, también modula conductas secundarias dependientes de motivación que incluyen a la anhedonia. Empleando modelos animales de estrés crónico como medio para estudiar los cambios a nivel cerebral y correlacionan con el desarrollo de comportamiento de tipo anhedónico (Bai et al. 2014; Macedo et al. 2015; Wiborg 2013), que asemeja y es correlativo de un comportamiento similar a la depresión (Gueye et al. 2018; Knüppel et al. 2017; Papazoglou, Jean, and Gertler 2014). Adicional al estrés, la ingesta de dieta altamente calórica, pueden aumentar la predisposición al desarrollo de la depresión y cambiar los marcadores neuroquímicos en el hipocampo (Arcego et al. 2018). Estos cambios pueden surgir durante la pre-pubertad y persistir hasta etapas avanzadas de la vida. Tanto el estrés, como la dieta son factores que pueden aumentar la susceptibilidad a la depresión a través de diferentes mecanismos, y a su vez, interactuar entre sí (Macedo et al. 2015; Wiborg 2013). Por ejemplo, se pueden presentar alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica cortical (Witkin et al., 2007), proliferación y supervivencia de los tejidos del hipocampo (Chang et al. 2008; Gueye et al. 2018) e importantes cambios en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) hipocampales (Macedo et al. 2015). De hecho, la vía de señalización relacionada con BDNF en el hipocampo es más sensible a los efectos del estrés en etapas tempranas de la vida (Arcego et al. 2018).

Adicionalmente, el estrés relacionado a anhedonia induce la alteración de las subunidades del receptor de NMDA (subunidad NR2A), lo que puede estar relacionado con un cambio en la neurotransmisión glutamatérgica (Arcego et al. 2018; Portero-Tresserra et al. 2018). Además, Li y colaboradores 2017, demostraron en un modelo de estrés crónico que las células del CA1 presentaban un tamaño y cantidad disminuidas, capas de células más delgadas, brechas celulares aumentadas, desorden de células y agudización nuclear. En contraste, existe evidencia de que el bloqueo del receptor NMDA aumenta la transmisión del glutamato en roedores y humanos, esto en interneuronas GABAérgicas (Duman, Aghajanian, and Krystal 2016) y permite la sinaptogénesis, pareciendo ser un tratamiento eficaz para la depresión.

2.5 Alteraciones macroestructurales del cerebro en la conducta de adicción y la depresión-anhedonia

Los trastornos neuropsiquiátricos comparten rasgos comunes a lo largo de un espectro de dimensiones genéticas, neurobiológicas y clínicas (Chakravarty 2018). Por otro lado, el análisis macroestructural del cerebro durante los procesos de adicción y depresión-anhedonia ha dado un gran avance, principalmente debido al desarrollo tecnológico a nivel de análisis cuantitativo de imágenes. La técnica de imagen no invasiva para medir morfología cerebral más reciente y ampliamente utilizada es la obtención de imágenes por resonancia magnética para su análisis por morfometría basada en la deformación (MBD) (Gaser et al. 2012). En general, una imagen RM estructural es una imagen de moléculas de agua en una sección transversal o área del cerebro. La técnica aprovecha el hecho de que diferentes tipos de tejidos contienen

diferentes cantidades de agua y se muestran con diferentes tonos de gris (Fowler et al. 2007). La MBD es un método para identificar las diferencias anatómicas macroscópicas entre los cerebros de diferentes poblaciones de sujetos. El método implica la normalización espacial de las imágenes de RM estructurales de una serie de sujetos para que todos se ajusten al mismo espacio estereotáxico (Ashburner and Friston 2003). Por ende, es una técnica de análisis de imágenes relativamente nueva que puede usarse para identificar diferencias estructurales regionales en el cerebro ya sea transversalmente (es decir, estado basal) o a lo largo del tiempo (es decir, cambio prospectivo del neurodesarrollo) a través de grupos a partir de los gradientes de los campos de deformación que deforman las imágenes (Tosun et al. 2011). La morfometría ampliamente utilizada basada en vóxeles se basa en la segmentación automática de imágenes en materia gris, materia blanca y mapas de densidad de fluido cefalorraquídeo y una transformación aproximada del mapa de densidad de materia gris del cerebro de un sujeto en un espacio específico (Gaser et al. 2001, 2012; Lerch, Sled, and Henkelman 2011). Las mejoras recientes en la alineación de la imagen permiten una transformación mucho más precisa del cerebro de un sujeto en un espacio objetivo con morfometría basada en la deformación utilizada para proporcionar mapas cuantitativos más directos de la variación anatómica (Gaser et al. 2001; Matsuda 2016). Al evitar la necesidad de segmentar la imagen y utilizar métodos de registro robustos, la morfometría basada en la deformación es una técnica más adecuada y sensible para investigar la variación anatómica en los cambios prospectivos del neurodesarrollo de distintos fenotipos conductuales.

Durante la última década, la resonancia magnética (RM) ha revolucionado las habilidades de diagnóstico en la práctica de pequeños animales, proporcionando una

evaluación adecuada de las enfermedades neurológicas casi comparable a la que se logra en la radiología humana (Ricciardi 2018). Además, su utilidad es evidente en cuanto a dilucidar mecanismos del neurodesarrollo de algún padecimiento neurológico, ya que las estructuras con cambios se pueden estudiar en animales y poder ser comparados con resultados en humanos (Lerch et al. 2011; Makris et al. 2004; Wheeler et al. 2013). La resonancia magnética proporciona imágenes a detalle del cerebro, la médula espinal y la anatomía vascular, y tiene la ventaja de poder visualizar la anatomía de forma no-invasiva en los tres planos: axial, sagital y corona (Pasternak et al. 2018). Existen diferentes tipos de obtención de las imágenes, las cuales dependen del motivo de estudio. Dentro de estas se encuentran por imágenes ponderadas T1, en donde la secuenciación de imágenes de resonancia magnética T1W demuestra la anatomía; contraste con la imagen de recuperación inversa corta T1, la cuál es una aplicación especializada de la secuencia de pulsos de recuperación de inversión que establece el tiempo de inversión de la secuencia en 0.69 veces la T1 de grasa, suprimiendo la grasa en la imagen, observándose negro (Ricciardi 2018).

El fenotipado de animales pequeños usando MRI consiste en cuatro subpartes: preparación de animal, adquisición de RM, procesamiento de imágenes y finalmente el análisis estadístico (Lerch, Sled, and Henkelman 2011). En general, aquí se requiere que las imágenes de múltiples sujetos se registren en conjunto con alguna forma de normalización espacial. El resultado principal de la normalización espacial de una serie de imágenes es que todas se ajustan al mismo espacio estereotáxico, lo que permite realizar comparaciones región por región. Un segundo resultado es una serie de campos de deformación que describen las transformaciones espaciales requeridas para unir las formas de los diferentes cerebros con una misma plantilla. En cada campo de

deformación está codificada la información sobre las formas de la imagen individual, que se puede caracterizar adicionalmente mediante una serie de procedimientos estadísticos (Ashburner and Friston 2003). El objetivo es adquirir la mejor información posible, definir con precisión la correspondencia anatómica entre las diferentes imágenes e identificar cualquier diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio *in-vivo* o *ex-vivo*, de forma no invasiva (Lerch, Sled, and Henkelman 2011).

Dentro de estas técnicas de análisis estadístico, se utiliza la comparación de voxeles, donde este último es la unidad cúbica que compone un objeto tridimensional, constituyendo la unidad mínima procesable de una matriz tridimensional y es, por tanto, el equivalente del píxel en un objeto 2D. Un vóxel también tendrá en cuenta los valores de frecuencia y fase, así como el grosor de corte. Esto producirá una representación en 3D de los datos. De este modo, se pueden obtener un modelo preciso en tres dimensiones del cuerpo humano. Al igual que los píxeles, los voxeles no contienen su posición (x,y,z) en el espacio 3D, sino que esta se deduce por la posición del vóxel dentro del archivo de datos.

Muchos investigadores han llevado a cabo estudios de la morfometría cerebral mediante RM ya que la resolución de una exploración anatómica de un cerebro completo aumenta con un tiempo de adquisición más corto (Matsuda 2016), además, por el hecho de ser una técnica no invasiva, se pueden estudiar los mismos tejidos por diferentes técnicas que complementen los resultados del análisis cuantitativo de imagen, por ejemplo con técnicas histológicas. Como ya se ha mencionado, los enfoques de MBD detectan cambios morfológicos en todo el cerebro, y comparan cada vóxel con una plantilla cerebral estándar. Ya que estas deformaciones llevan la información sobre las diferencias estructurales entre los cerebros, se analizan para cada vóxel y se pueden usar

para inferir las diferencias locales (Bühler and Mann 2011). Los resultados empleando este sistema, han evidenciado que el desarrollo y la consolidación de alteraciones conductuales también incluye cambios a nivel de la macroestructura cerebral.

Históricamente, el NAc, VTA y las vías de dopamina mesolímbicas asociadas, se han considerado los componentes clave de la recompensa y el placer (Koob and Volkow 2016). Sin embargo, los hallazgos recientes de neuroimágenes sugieren un modelo más complejo de recompensa que incluye la NAc, VTA, amígdala, córtex de la corteza prefrontal, putamen y corteza orbitofrontal que se asocian al procesamiento de recompensas al utilizar tareas de comportamiento diseñadas para evaluar aspectos específicos de la recompensa, incluida la anticipación, la motivación y la expectativa.

Como ejemplo, el estudio de cambios estructurales observados en pacientes alcohólicos en comparación con controles sanos, Bühler reporta un espesor reducido del cuerpo calloso, aumento de los ventrículos y aumento del volumen de líquido cefalorraquídeo (LCR) en varias zonas intracraneales en el cerebro (Figura 6). Además, Becker (2017), evidenció mediante un estudio clínico, que el control regulatorio e inhibitorio del circuito de la recompensa, se encuentra comprometido en pacientes con alcoholismo crónico, reflejado en una reducción de conectividad fronto-estriatal mediante resonancia magnética funcional. Además, también se reporta un incremento en la activación del estriado ventral, sugiriendo un incremento en la respuesta hacia la anticipación de la recompensa.

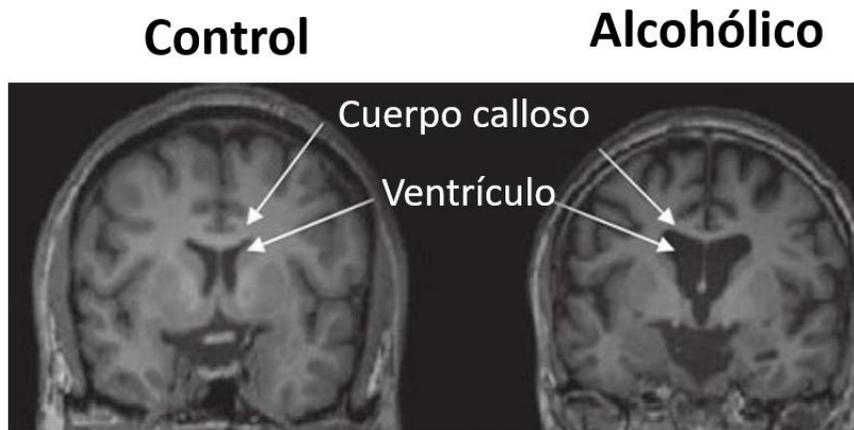


Figura 6. Daño estructural del cerebro en un paciente dependiente del alcohol comparado con un control saludable de la misma edad. Las imágenes coronales muestran los efectos del alcohol en el cerebro; un cuerpo calloso más delgado, agrandamiento de los ventrículos y atrofia cortical generalizada, empleando morfometría basada en la deformación (Modificada de Bühler 2011).

Por su parte, en sujetos con adicción a la cocaína, se observan volúmenes reducidos de materia gris (MG) en regiones del cerebro que son críticas para la recompensa, la memoria, la inhibición y otras funciones, que incluyen el lóbulo frontal y la corteza orbitofrontal (Alia-klein et al. 2011), corteza cingulada anterior (Franklin et al. 2002), amígdala (Makris et al. 2004), ínsula (Franklin et al. 2002), cuerpo estriado ventral (Sim et al. 2007), tálamo (Sim et al. 2007), hipocampo (Alia-klein et al. 2011) y corteza temporal (Alia-klein et al. 2011; Franklin et al. 2002; Sim et al. 2007) corteza premotora y cerebelo (Sim et al., 2007). Además, Garza-Villarreal (2017) reporta cambios morfológicos por resonancia magnética en pacientes con adicción al crack, relacionados con la edad y los años de consumo de cocaína. Interesantemente, encontraron que los cambios morfológicos estriatales pueden estar más relacionados con la edad, mientras que los cambios talámicos pueden estar más relacionados con los años que consumen la droga. Finalmente, existen estudios que definen cambios macroestructurales en el cerebro basados en análisis de imagen. Thanos (2016), ha

evidenciado incremento del volumen del estriado por resonancia magnética en ratas con administración crónica de metanfetaminas, lo que en cierta medida contrasta con lo reportado en el humano.

Existen numerosos estudios que muestran cambios en el volumen de regiones involucradas en el circuito de la recompensa en modelos con depresión mediante análisis de imágenes obtenidas por resonancia magnética. En principio, se ha sugerido que las personas con trastornos del estado de ánimo o de ansiedad tienen errores de codificación de la memoria que resultan en experiencias exageradas o malinterpretadas del evento (Ezzati et al. 2013; Y. Li et al. 2017). Estudios de imagen han encontrado un volumen reducido del hipocampo en la depresión (Campbell, Marriott, and Macqueen 2004) y otros trastornos relacionados con el estrés (Y. Li et al. 2017), y esto lo relacionan con una atrofia dendrítica en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Russo and Nestler 2013). Empleando modelos animales de estrés crónico en roedores, se ha demostrado la existencia de respuestas conductuales de tipo depresivo o ansioso al aumentar el tono excitatorio en las neuronas glutamatérgicas (Vyas, Pillai, and Chattarji 2004). Los estudios del PFC se han concentrado en gran medida en la COF y la PFC medial (mPFC), incluida la corteza cingulada anterior. Los pacientes con depresión mayor tienen un volumen cortical más pequeño, incluido volumen reducido de materia blanca, en el COF y mPFC mediante análisis de imágenes de resonancia magnética en humanos (Val-laillet et al. 2015). Se cree que los cambios en el tamaño y la actividad del PFC resultan, en parte, de la pérdida de las células gliales o de la atrofia neuronal que es evidente en el tejido post-mortem. Una repercusión de esto es que estos sean causa de las deficiencias en el sistema glutamatérgico, ya que se sabe que contribuyen en el proceso de transmisión glutamatérgica (Russo and Nestler 2013). Adicionalmente, se

detectaron reducciones o aumentos de la materia gris derivada de la RM en diseños de estudios transversales en trastornos de depresión o ansiedad, experiencia en navegación, personalidad, funciones cerebrales emocionales o basales (Lerch et al. 2011; Witte et al. 2010)

Con todo lo anterior, estudios en animales y en humanos confirman que al igual que en la adicción a diversas drogas, los alimentos apetecibles, son capaces de activar regiones del sistema límbico, los cuales, a su vez, ha demostrado que alteran la motivación por recompensas naturales y que se integran en el mismo circuito que regula cambios en la anhedonia y depresión (Hsu et al. 2017; Koob and Volkow 2016; Thanos et al. 2016). Aunque, a la fecha el origen de la activación defectiva de los circuitos que regulan el desarrollo de conductas aberrantes parece no estar clara, se ha propuesto que la exposición a estímulos externos o ambientales pueden jugar un papel importante en su desarrollo. En este contexto, se propone que la susceptibilidad al desarrollo de conductas que involucran la activación del sistema de recompensa o mesocorticolímbico puede modularse a través de programación fetal.

2.6 La Programación Fetal y su implicación en la modulación de conductas motivantes asociadas a adicción y depresión-anhedonia

Evidencia epidemiológica ha propuesto que los estímulos del medio ambiente durante la peri concepción, la gestación y la lactancia modula el desarrollo de los individuos, conduciendo a la predisposición a enfermedades durante etapas posteriores de la vida (Barker, 1990).

El concepto de programación fetal se basa en observaciones epidemiológicas y experimentales de asociaciones cercanas entre un entorno intrauterino adverso y la aparición posterior de trastornos metabólicos y conductuales en adultos. En específico, durante el embarazo algunas perturbaciones ambientales como son estrés, infecciones y cambios nutricionales, pueden predisponer al producto a presentar enfermedades selectivas (Chang et al. 2008) (Figura 7). Se ha definido a la programación fetal como un proceso de adaptación a un ambiente intrauterino adverso que altera el entorno metabólico y hormonal fetal, lo que resulta en el restablecimiento de los procesos de desarrollo para garantizar la supervivencia del feto (Bale 2015). Sin embargo, la descendencia programada desarrolla diversas patologías que incluyen, hiperfagia profunda, obesidad, hipertensión, hiperinsulinemia e hiperleptinemia durante la vida adulta y la nutrición hipercalórica posnatal amplifica las anomalías metabólicas y cardiovasculares inducidas por la programación fetal (Bale 2015; Breier et al. 2001). De interés, la programación fetal por ingesta desmedida de alimento calórico también está vinculada al desarrollo de comportamientos aberrantes en la descendencia que incluyen adicción, ansiedad, autismo, depresión, entre otras.

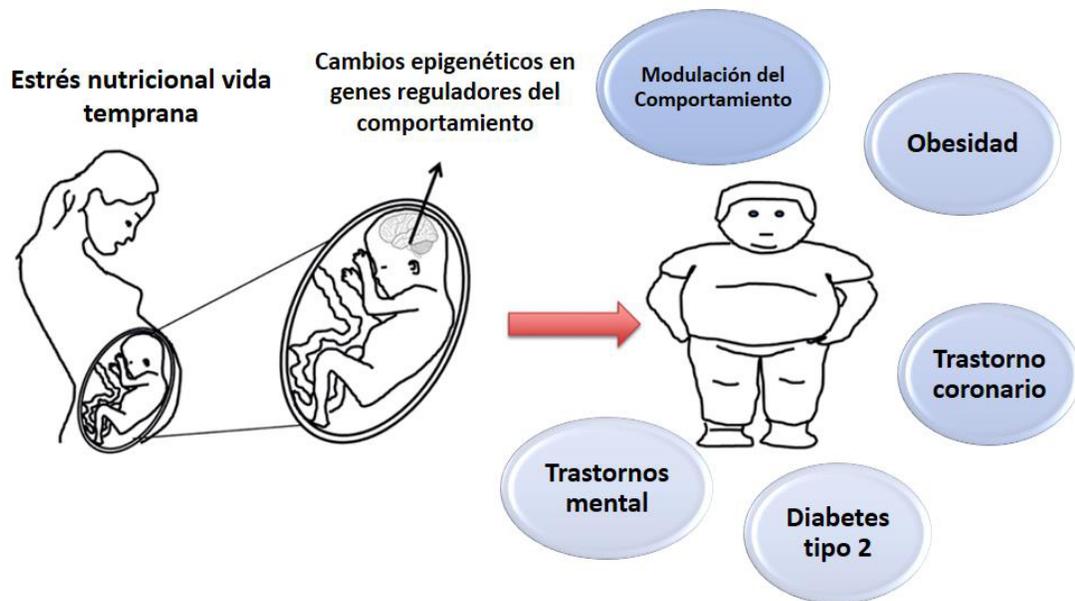


Figura 7. Programación fetal y sus efectos en la adultez de la descendencia. La exposición a estímulos o efectos ambientales durante periodos críticos de desarrollo, tales como infecciones, drogas, estrés y dieta, conduce a cambios aberrantes permanentes tanto en la fisiología incluyendo riesgo aumentado de padecer diabetes y obesidad, como trastornos mentales siendo depresión, adicción, ansiedad, autismo, esquizofrenia, entre otras. Estas consecuencias se observan a menudo en periodos avanzados de vida, como lo es la etapa adulta. Aunque no se conoce del todo bien los mecanismos por los cuales ocurren estos desórdenes, evidencias apuntan a que existe intervención de cambios epigenéticos, además de inflamación, que realizan efectos sobre los tejidos importantes encargados de la regulación del desorden, principalmente en épocas críticas del desarrollo.

Evidencia epidemiológica ha identificado que el trastorno depresivo mayor (TDM) y la obesidad se asocian dentro de las personas, pero se sabe poco sobre la asociación entre el TDM y la obesidad en las familias. Marmorstein et. al (2016), reportaron en un estudio clínico asociación directa entre la obesidad materna y el riesgo de la descendencia a padecer TDM, mientras que se presenta una asociación negativa para la obesidad paterna. Lo anterior indica que el riesgo de presentar TDM parece ser selectivo al sexo posiblemente dependiente de los perfiles hormonales. Estudios en

modelos animales han demostrado que una exposición materna a una dieta alta en grasa (principalmente ácidos grasos saturados), afectó el desarrollo físico y neural de la progenie y provocó retrasos en la plasticidad fenotípica motriz y sensorial y alteraciones neuro conductuales de tipo depresivas en la vida adulta, potencialmente asociado a efectos lipotóxicos en las células progenitoras neurales y sistemas de neurotransmisores (Peleg-Raibstein, Luca, and Wolfrum 2012; Rivera, Christiansen, and Sullivan 2015; Sullivan, Nousen, and Chamlou 2013). Además, Abildgaard (2014), muestra que la exposición materna a dieta alta en grasa altera el eje HPA de respuesta al estrés (Abildgaard et al. 2014). Además, estudios recientes realizados por Sarker y Col., empleando un modelo murino demostraron que madres expuestas a comida alta en grasa promueve el incremento de comportamientos motivante para obtener drogas y comida en la descendencia (Camacho et al. 2017; Sarker et al. 2016). Aunque a la fecha no se conocen con certeza los mecanismos implicados en el desarrollo de conducta depresión-anhedonia, se sabe que la dieta juega un papel importante en períodos críticos de neurodesarrollo (Ahmed et al. 2010; Gueye et al. 2018), afectando la micro y macroestructura cerebral (Y. Li et al. 2017; Sasaki et al. 2014).

Finalmente, a nivel microestructural, la ingesta de dieta alta en grasa crónica disminuye marcadores sinápticos importantes (subunidad GluR2 de AMPA y la enzima responsable de la síntesis de GABA, ácido glutámico descarboxilasa), conduciendo a una reducción de la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica en el hipocampo. Adicionalmente, existen estudios donde se han obtenido estos tipos de comportamiento por efecto de la dieta alta en grasa (Arcego et al. 2018; Sasaki et al. 2014; Sharma and Fulton 2013; Spencer and Andrews 2015) y dieta alta en azúcar (Ahmed et al. 2010;

Gueye et al. 2018), donde involucran una alteración en regiones involucradas en el circuito mesocorticolímbico. Por lo anterior, en este estudio se centró en describir si la programación fetal por nutrientes hipercalóricos promovía cambios en la conducta de motivación de tipo depresiva-anhedonia, y su correlación con alteraciones macro y microestructurales del cerebro en un modelo murino.

En su conjunto, la obesidad y los trastornos relacionados a esta se han convertido en un importante problema de salud en la sociedad moderna y es ampliamente aceptado que la obesidad en los humanos se debe comúnmente a factores dietéticos y de estilo de vida. Los mecanismos por los cuales la dieta y el medio ambiente modulan el comportamiento de la descendencia son poco conocidos hasta el momento. Sin embargo, la creciente evidencia sugiere que el origen de algunos trastornos del comportamiento, que se manifiestan en la vida adulta, puede tener sus raíces antes del nacimiento. El apoyo inicial a la hipótesis de los "orígenes fetales" se basó en estudios epidemiológicos de resultados de salud adversos en humanos en los que el tamaño al nacer se relacionó con la aparición de trastornos metabólicos o cardiovasculares en la edad adulta (Breier et al. 2001; Camacho et al. 2017; Peleg-Raibstein, Luca, and Wolfrum 2012). Este trabajo pretende generar conocimiento acerca de la neurobiología de este tipo de comportamientos:

CAPITULO 3

JUSTIFICACIÓN

La programación nutricional materna durante el embarazo y lactancia en humanos incrementa el desarrollo de trastornos psiquiátricos que involucran el decremento de la motivación en la descendencia. Se conoce que la descendencia presenta alteraciones en la estructura cerebral implicadas en la modulación conductual. Sin embargo, los correlativos a nivel de plasticidad macro y microestructural en el cerebro humano se desconocen.

Por lo anterior, en esta tesis se empleó un modelo murino para evidenciar si la descendencia de madres sometidas a programación nutricional muestra conducta similar a la depresión-anhedonia, que correlacione con alteraciones en la plasticidad macro y microestructural a nivel de sinapsis de glutamato.

CAPITULO 4

HIPÓTESIS

La programación nutricional materna incrementa en parte la susceptibilidad a trastornos conductuales semejantes a la anhedonia en la descendencia mediante alteraciones en la estructura cerebral y de las sinapsis glutamatérgicas en ratas Wistar.

CAPITULO 5

OBJETIVOS

5.1.1 Objetivo General

Identificar las alteraciones en la estructura cerebral y sináptica de la descendencia de ratas expuestas a programación nutricional de dieta hipercalórica con conducta similar a la anhedonia-depresión.

5.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Evaluar el comportamiento de la descendencia de madres expuestas a programación nutricional por dieta hipercalórica y dieta control
- 2) Identificar los cambios en las proteínas sinápticas glutamatérgicas de regiones cerebrales de la descendencia
- 3) Evidenciar si la programación nutricional en madres promueve cambios en la estructura cerebral de la descendencia

CAPITULO 6
MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material de Laboratorio

Tabla 2. Material Biológico y No biológico
No Biológico
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pellets de chocolate (45mg), BioServ/ No. Catálogo F05472).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comida estándar para rata (LabDiet/ No. Catálogo 5001). ▪ Dieta de cafetería (CAF) con 372 Kcal/100g distribuidas en 39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estuche de disección.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rat Brain Atlas, Paxinos y Watson.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vaso de precipitado de 50 mL, 100 mL, 1000 mL
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Matraz de aforación 500 mL y 1000 mL
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Micropipetas eppendorf de 1000 µL, 100 µL, 10 µL.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Puntillas para micropipetas: azules, amarillas y blanca, estériles.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tubos eppendorf de 1.5 mL, 0.6 mL y 0.2 mL, estériles.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tubos Falcon 50 mL y 15 mL, estériles.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Guantes sin talco.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gradillas de plástico.
Biológico
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ratas Wistar (n=97 distribuidas entre los 3 grupos) Sexo: machos y hembras. Peso: 250-300 gramos Edad: 8 – 10 semanas.

Reactivos
▪ Paraformaldehído (SIGMA-ALDRICH P6148-1KG)
▪ Phosphate Buffered Saline (SIGMA P4417-100TAB)
▪ Tritón X-100 (SIGMA T9284-100ML)
▪ ProHance Gadoteridol 0.5M (BRACCO)
▪ Anticuerpo anti-GluR2 (Cell Signaling)
▪ Anticuerpo anti-GluR1 (Cell Signaling)
▪ Anticuerpo anti-NR1 (Cell Signaling)
▪ Anticuerpo anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling #7074S)
▪ Anticuerpo anti-Sinaptofisina (abcam ab14692)
▪ Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (abcam ab64264)
▪ Etanol grado reactivo (CTR Scientific)
▪ Xilol
▪ Buffer de Citratos pH 6
▪ Fomblin (SIGMA-ALDRICH 317926-100G)

Equipos de Laboratorio
▪ Criostato
▪ Microcentrífugas
▪ Microscopio de luz
• Sonicador Fisher Scientific modelo FB120
• Resonador Bruker 7T modelo Bipspin 7.0 teslas (7.0T) 300 Mhz Software Paravision 6.01

6.2 Estrategia Experimental

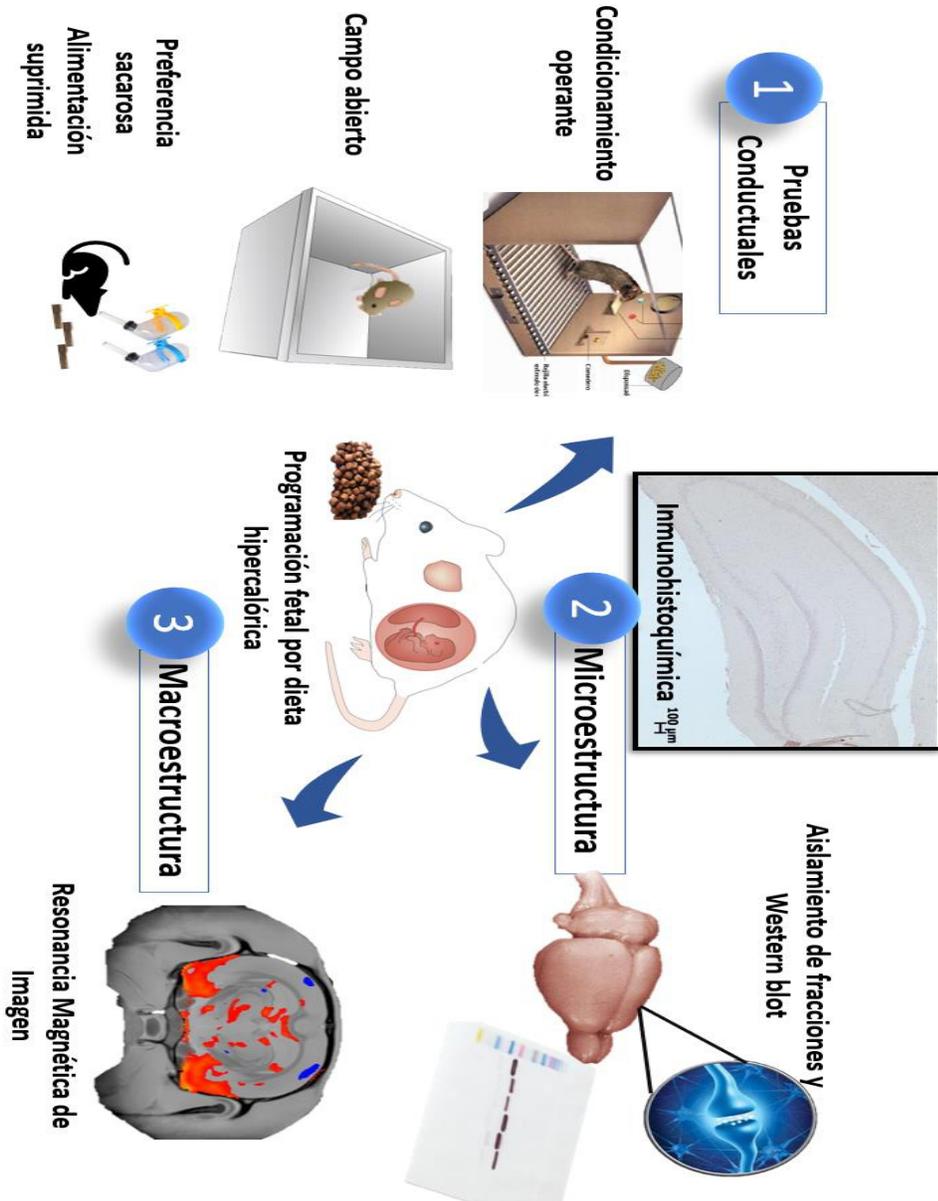


Figura 8. Esquema general de la estrategia seguida. Posterior a la inducción de programación fetal de las madres, se agrupó a la descendencia de machos en 26 número de ratas control, 37 programación fetal y 35 programación fetal alimentadas con dieta cafetería después del destete (21 días de edad). Se evaluó a la descendencia de cada grupo con diferentes pruebas para identificar cambios en la motivación que incluyen: prueba de condicionamiento operante (COP), preferencia a sacarosa (PS), campo abierto (CA) y alimentación suprimida novedosa (ASN). Al finalizar las pruebas, se realizó el estudio de la microestructura de las regiones involucradas en el sistema de la recompensa (NAc, hipocampo y corteza prefrontal) mediante técnicas de western blot e inmunohistoquímica, utilizando

marcadores de plasticidad sináptica (NMDA, AMPA y Syp). Por último, se evaluó la macroestructura con un análisis de imagen de resonancia magnética estructural empleando diferencias morfométricas de volumen de las distintas regiones del SNC.

6.3 Metodología

Se utilizaron 98 ratas de la cepa Wistar; machos de 8 – 10 semanas de edad y un peso entre 250 - 300 gramos. Los animales fueron producidos y manejados en el laboratorio de Neurometabolismo y Bioterio del CIDICS de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, con la aprobación del Comité local de Cuidado de Animales (BI 15-007). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. Todos fueron alojados individualmente en jaulas, mantenidos a 20-23 ° C en una habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. El agua estaba disponible ad libitum en la jaula del hogar, excepto durante la sesión experimental.

6.3.1 Programación Fetal

1. Ratas Wistar hembras de 8-10 semanas de edad fueron alimentadas con diferentes dietas (Cafetería y Control, ver tabla 2) por 9 semanas (pre-embarazo, embarazo y lactancia) divididas en tres grupos experimentales: 1) Control-Control (C-C), Cafetería-Control (CAF-C) y Cafetería-Cafetería (CAF-CAF), como se indica en figura 9.
2. Posterior a las 3 semanas de iniciar el experimento, las ratas se cruzaron con un macho Wistar de 12 semanas de edad, peso de 300-350 g.

3. Se verificó el embarazo de las hembras mediante examinación de tapón vaginal y se continuó con la dieta selectiva durante las siguientes 3 semanas de gestación.
4. Posterior al destete la descendencia se alimentó con dieta control para las que provenían del grupo control y del grupo de CAF o bien con dieta CAF para el segundo grupo de dieta CAF. Es importante mencionar que la dieta CAF contiene una densidad calórica de 372 kcal/100 g distribuidas en 39 % carbohidratos, 49 % lípidos y 12 % proteínas.
5. Se alimentó a la descendencia de cada grupo hasta cumplir los 2 meses de edad.
6. Al alcanzar los 2 meses de edad se iniciaron las pruebas conductuales para evaluar la motivación a obtener recompensas naturales que incluyen: Condicionamiento Operacional (protocolos FR1, FR5 y PR en la caja de Skinner), preferencia a sacarosa, campo abierto y alimentación suprimida.

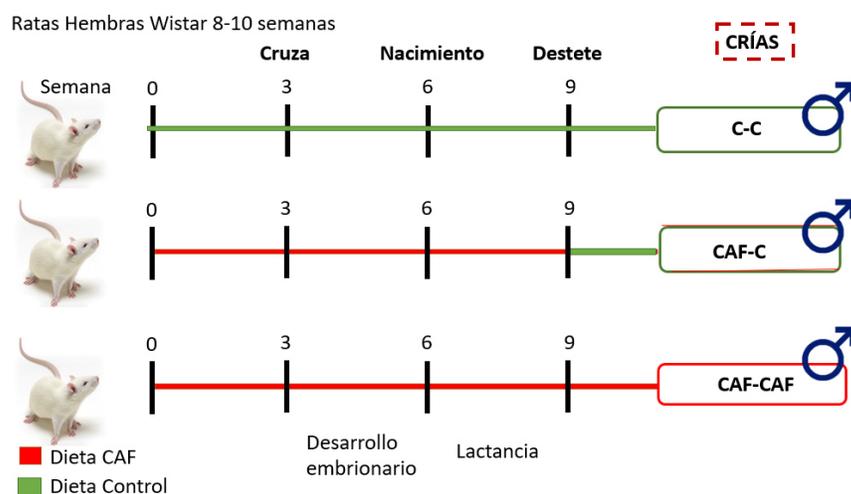


Figura 9. Línea de tiempo seguida para la generación de los diferentes grupos de estudio. La línea de tiempo abarca desde 3 semanas antes de la cruce, durante el período de gestación, lactancia y destete. La línea verde indica los períodos de alimentación con alimento control, mientras que la línea roja los períodos con alimentación CAF. Se generaron 3 grupos donde el primer grupo corresponde a la alimentación de la madre y de la descendencia con dieta control, para el segundo grupo, la madre

fue alimentada con dieta cafetería y su descendencia con dieta control, y para el último grupo, tanto la madre como su descendencia fueron alimentadas con dieta CAF.

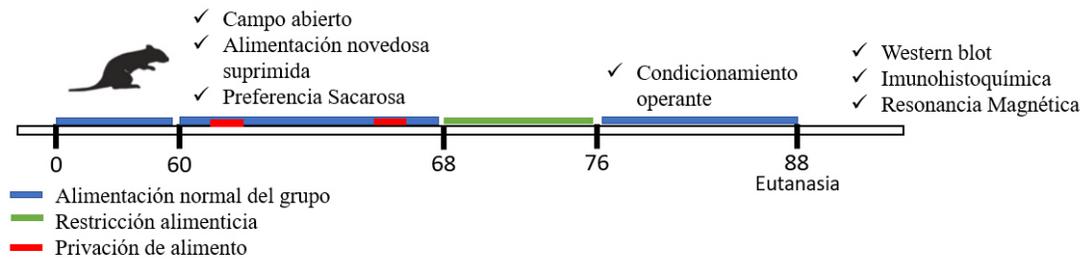


Figura 10. Línea de tiempo indicando el protocolo empleando. Se muestra en la figura los períodos de alimentación con dieta correspondiente al grupo (control o CAF) de color azul y la restricción de color verde y la privación de color rojo, según la prueba conductual la indique. Las pruebas conductuales se realizaron a los 60 días posnatales, con excepción del condicionamiento operante que comenzó al día 76, después de la restricción alimenticia. La eutanasia se llevó a cabo un día después de haber finalizado la prueba de condicionamiento operante. Se obtuvieron los cerebros protegidos por el cráneo, esto para su análisis por RM, y para los westerns blot e inmunohistoquímica no fue necesario el estar protegidos por el cráneo.

6.3.2 Condicionamiento operante empleando la caja de Skinner

1. Para los tres grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo de programación fetal (C-C, CAF-C y CAF-CAF), se agruparon (8-9 ratas) en cajas individuales.
2. Se sometió a restricción calórica a cada grupo de ratas antes de comenzar el entrenamiento. Contemplando que las ratas comen diariamente el 10% de su peso (25-30g), sólo se les proporcionó 15 gramos de comida control por día, durante 7 días.
3. Las ratas se sometieron a prueba de entrenamiento de condicionamiento operante siguiendo protocolos establecidos (Sharma, et al., 2012) y las indicaciones del fabricante de la caja de entrenamiento OmniAlva.

4. Las ratas se entrenaron individualmente siguiendo los protocolos FR1, FR5 y PR, con los parámetros de asociación a: 2 segundos de luz y 2 segundos de sonido con 5 segundos de inter-ensayo, ajustados a la liberación del pellet en el receptáculo de la caja.
5. La duración de cada protocolo es el siguiente:
 - Protocolo FR1 por 3 días consecutivos; duración 1 hora.
 - Protocolo FR5 por 4 días consecutivos; duración 1 hora.
 - Protocolo PR por 5 días consecutivos; duración dependiendo de la actividad del animal, máximo 1 hora. $PR = [5e^{(R*0.2)}] - 5$, en donde R es igual al número de recompensas ganadas menos 1. Con ello, se requiere el siguiente orden de estimulación en la palanca para ganar una recompensa: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, etc.,
6. Se colocó la cantidad de comida estándar correspondiente, a cada rata, después de terminado cada protocolo como sigue:
 - Protocolo FR1 se expuso a 30 gramos de comida estándar.
 - Protocolo FR5: se expuso a comida estándar *ad libitum*.
 - Protocolo PR: se expuso a comida estándar *ad libitum*.

7. Las ratas se categorizaron con presentar conducta semejante a la adicción con base a mostrar más de 10 veces en los protocolos FR1 y FR5, y más de 5 veces en el protocolo PR, indicando un total de 32 estimulaciones de palanca en un periodo de 1 hora.

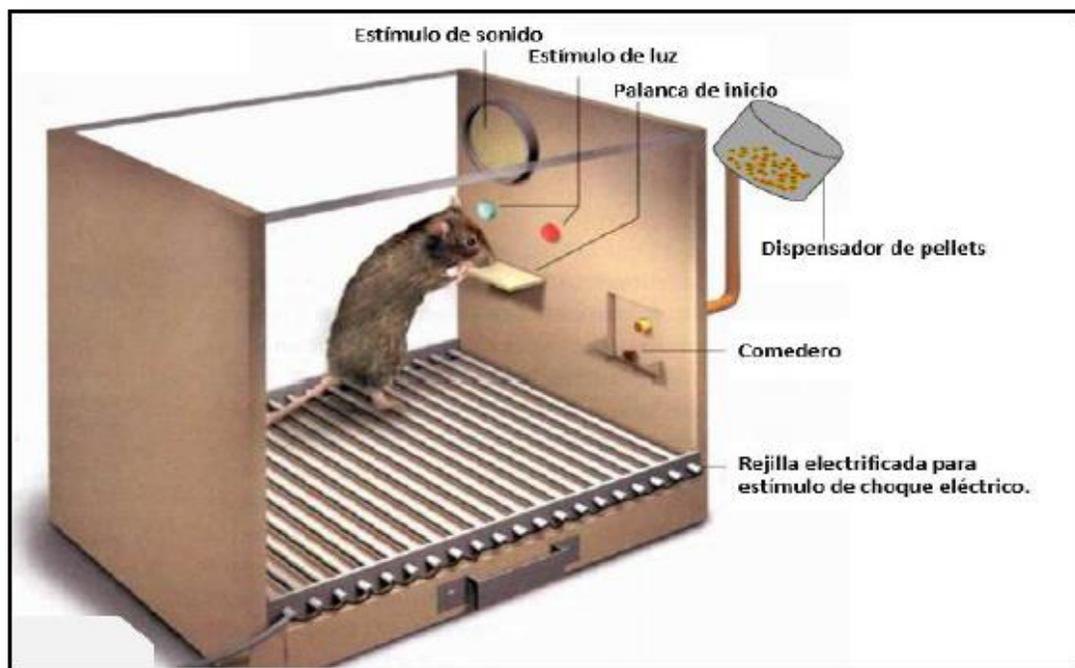


Figura 11. Caja tipo Skinner para evaluar el condicionamiento operante a recompensas. El sistema incluye una palanca de estimulación que se activa para liberar la recompensa. La liberación de la recompensa se asocia a la emisión de un sonido y una luz que condiciona al animal a asociar su liberación con el accionar de la palanca. La prueba consta de 3 protocolos, donde el plan de refuerzo de relación fija 1 (FR1) consiste en entrenar al modelo a que asocie que una accionar de palanca equivale a una recompensa; en el plan de refuerzo de relación estable a 5 (FR5) se basa en retar al modelo a que desarrolle una motivación con un poco más de esfuerzo para obtener la recompensa, donde 5 accionar de la palanca equivale a una recompensa; y por último, el índice de refuerzo progresivo (PR), consta del desarrollo de la realización de un esfuerzo mayor para obtener la recompensa, donde el costo de una sola recompensa aumenta progresivamente a medida que se van alcanzando las mismas, empleando la fórmula, $PR = [5e (R*0.2)] - 5$. Cabe mencionar que, en el protocolo PR es donde podemos evaluar certeramente la motivación que existe por las recompensas.

6.3.3 Prueba de preferencia a la sacarosa

1. Para los tres grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo de programación fetal (C-C, CAF-C y CAF-CAF), se agruparon en cajas individuales. Se colocaron 2 bebederos en las jaulas, uno que contenía agua y el segundo contenía solución de sacarosa al 2 % p/v. Se cuantificó la ingesta de sacarosa por 72 horas, lo cual representó la línea de ingesta basal.
2. Se les privó de alimento y agua durante 16 horas, correspondiendo a la fase de estrés del protocolo.
3. Posteriormente, los bebederos con agua y sacarosa 2 % p/v se colocaron nuevamente en sus jaulas y se midió el consumo total de ambos líquidos por 20 minutos.
4. Se cuantificó el porcentaje de preferencia a la sacarosa tanto de la línea base como en el día de prueba con la fórmula:

$$\%PS = [IS \div (IS + IA)] \times 100$$

6.3.4 Prueba de alimentación novedosa suprimida

1. Las ratas de los tres grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo de programación fetal (C-C, CAF-C y CAF-CAF), se privaron de alimento por 18 horas, se colocó un pellet de comida (correspondiente a la dieta habitual) en el centro de una arena de campo abierto con paredes transparentes y una dimensión de 50 x 50 x 50 cm.

2. Se colocó al modelo animal en una esquina de la arena, y se midió el tiempo que tardó en alcanzar su alimento en el centro de esta. Si el animal no alcanzó el alimento en 5 min, la prueba se finaliza.
3. Los animales que alcanzaron el alimento se trasladaron a una jaula individual con alimento previamente pesado y se registró la ingesta de alimento durante los siguientes 20 min.

6.3.5 Prueba de campo abierto

1. Se permitió a los modelos animales explorar libremente la arena de 50 x 50 x 50 cm
2. Se videograbó por 5 minutos el recorrido total en la arena empleando un sistema automático de sensor de movimiento
3. Se analizó la distancia total recorrida, el porcentaje de inactividad, tiempo que paso en el centro y en las orillas de la arena, empleando el software de la compañía OMNIALVA.

6.3.6 Perfusión intracardiaca

1. Los modelos animales de los tres grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo de programación fetal (C-C, CAF-C y CAF-CAF), fueron sacrificados por sobredosis de Pentobarbital (PiSA Agropecuaria) (1mL) por vía intraperitoneal

2. Se realizó disección dérmica que va desde la región abdominal hasta la parte superior de la caja torácica, exponiendo el corazón (Figura 12).

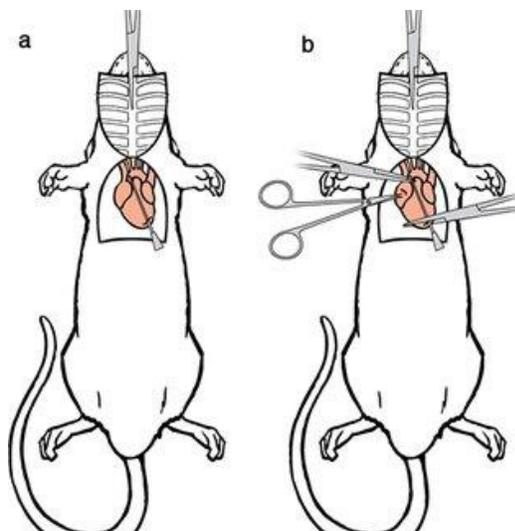


Figura 12. Imagen representativa de la técnica de perfusión intracardiaca. Se basa principalmente en la inserción de un sistema de flujo por el vértice del ventrículo izquierdo (a), a la par de la apertura del sistema circulatorio del modelo realizando incisión de la aurícula derecha (b).

3. Se perforó el ventrículo izquierdo del corazón siguiendo su vértice y se realizó un corte en la aurícula derecha, con el fin de abrir el sistema circulatorio. Se perfundió solución de lavado PBS 0.1 M + Heparina + PROhance (6 mM) empleando una bomba de perfusión (Fisher Scientific GP1000) a flujo de 20 mL/min.
4. Posteriormente, se cambió la solución de lavado por la solución fijadora que incluye al paraformaldehído 4% en PBS 0.1 M (PFA) + Prohance 60 mM durante 20 min, siguiendo el mismo flujo.
5. Se colectó el cerebro protegido por el cráneo del modelo y se removió la piel, la mandíbula inferior, las orejas y la punta de la nariz cartilaginosa.

6. Las muestras se almacenaron a 4°C en PFA al 4% Prohance 60 mM por 24 horas y posteriormente se cambió la solución a PBS 0.1 M con azida de sodio 0.02% hasta su posterior análisis en la resonancia.

Las imágenes de resonancia magnética pueden adquirirse luego de 4 días y no más de 2.5 meses después de la fijación.

6.3.7 Obtención de imágenes de Resonancia Magnética Nuclear y su análisis por morfometría en base a deformación

1. Los cerebros de los modelos animales protegidos por el cráneo se colocaron individualmente para su análisis en un cilindro transparente con fondo en punta con 35 mL de Formblin, un perfluoropoliéter (SIGMA-ALDRICH 317926-100G) que tiene un efecto dieléctrico bajo y una señal de RM mínima, con lo que aumenta el contraste y elimina los artefactos de susceptibilidad no deseados próximos a los límites del cerebro, Además, se evitó la formación de burbujas en el interior.
2. Se introdujeron los cilindros en la bobina del resonador a 45 cm de distancia de la entrada al centro del resonador y se alinearon con el cráneo en dirección al resonador.
3. Las imágenes de los cerebros se adquirieron usando resonador Bruker 7 T Paravisión 6.0.1 system, donde la relación señal/ ruido se llevó aproximadamente a 20 gastando una resolución mejorada, ya que es el valor que proporciona una compensación óptima para el registro de la computadora.

4. Se posicionó el cráneo en el resonador mediante la rotación de la imagen prediseñada evaluó la homogeneidad del campo observando el contraste de la imagen. Se obtuvieron las imágenes con tiempo de repetición (TR) / tiempo de eco (TE) = 100 / 2.5 ms, matrix= 256 x 256, tiempo de escaneo = 52:11 minutos con campo de visión (FoV) 50x50, TA= 12 s 800 ms, FA= 30 con tamaño de vóxel de 0.19 mm³ de imágenes isotrópicas con orientación sagital.
5. Se evaluó la calidad de imagen observando irregularidades en el campo (artefactos por burbujas). Las imágenes se cargaron a la nube virtual del laboratorio en formato DICOM, a través del cual se pudieron descargar para futuros análisis.

6.3.8 Preprocesamiento ponderado en T1 y procesamiento de imágenes

Cabe señalar que todos los análisis de la macroestructura cerebral se llevaron a cabo por el Dr. Eduardo Garza Villarreal.

Las imágenes ponderadas en T1 se convirtieron de formato DICOM a MINC para el preprocesamiento. Las imágenes T1 se preprocesaron utilizando una tubería de preprocesamiento interna con el software Bpipe (http://cobralab.ca/software/mincbeast_bpipe.html), que hace uso del kit de herramientas MINC (<http://www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesSoftware/ServicesSoftwareMincToolKit>) y Advanced Normalization Tools.

Se realizó la corrección de campo de polarización N4, registro lineal en el espacio del Instituto de Neurología de Montreal usando herramientas de normalización avanzadas,

seguido de la transformación de nuevo a espacio nativo. Las imágenes se ingresaron en el MiceBuildModel (<https://wiki.mouseimaging.ca/display/MICePub/MICe-build-model>). MICe-build-model.pl es un paquete de software optimizado para realizar el registro de imágenes en cerebros de ratones. El registro puede definirse como el ajuste de dos o más imágenes a una imagen promedio. Las diferencias entre la imagen promedio y las imágenes individuales nos permiten calcular las diferencias de medias entre 2 o más grupos de ratones. Primero se creó un cerebro plantilla usando la media de todos los cerebros de forma no lineal. Esta plantilla fue la usada para el MBD. Para el análisis, se creó una máscara de cerebro a mano.

6.3.9 Inmunohistoquímica

6.3.9.1 Procesamiento de tejidos en parafina

1. Posterior a la fijación, los cerebros se disecaron a partir del cráneo y se lavaron con PBS hasta remover completamente el fijador
2. El tejido se deshidrató en etanol siguiendo la secuencia: 50, 70, 80, 95 y 100% de etanol con incubación de 10 minutos entre cada uno.
3. Se intercambié el etanol por xileno con incubación de 10 minutos en la siguiente secuencia: 2:1, 1:1, 1:2 Etanol: Xileno y 3 incubaciones con Xileno 100% por 10 minutos.
4. Se intercambio el xileno por parafina siguiendo la secuencia: 2:1, 1:1, 1:2 xileno: parafina por 30 minutos y 2 incubaciones con parafina 100% por 2 horas.

5. Los cerebros embebidos en parafina fueron cortados en un criostato en secciones coronales de 5 μ m de espesor en dirección rostro-caudal, a nivel de regiones correspondientes a NAc, Hipocampo y PFC, localizadas con el atlas de cerebro de rata Paxinos, George, and Charles Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier, 2006.
6. Los cortes se hidrataron siguiendo la secuencia de Xilol (15 minutos), Etanol absoluto y Xilol 1:1 (10 minutos), Etanol absoluto (5 minutos), Etanol 96% (5 minutos) y finalmente agua destilada.
7. Se realizó la recuperación de epítomos sumergiendo los cortes en buffer de Citratos a 90 °C durante 20 minutos
8. Los cortes se lavaron con PBS + TritonX-100 0.1 % y se incubaron con el bloqueador de peroxidasa durante 10 minutos (Kit AB64264)
9. Se lavaron con PBS + TritonX-100 0.1 % y se incubaron con el bloqueador de proteínas durante 10 minutos (Kit AB64264)
10. Se incubaron con PBS + TritonX-100 0.1 % y posteriormente con el anticuerpo primario anti-sinaptofisina con dilución de 1:200 (ab14692) a 4°C durante toda la noche.
11. Se realizaron lavados en PBS (3 lavados de 5 minutos) y se incubaron en anticuerpo secundario (Kit AB64264) de IgG de cabra anti-conejo biotinilado por 10 minutos.
12. Se realizaron lavados en PBS (3 lavados de 5 minutos) y posteriormente incubación con estreptavidina (AB64264) por 10 minutos.

13. Se añadieron 2 gotas de una solución del cromógeno diaminobencidina DAB (30 μ L en 1.5 mL de sustrato) y se incubó por 10 minutos.
14. Se realizó la tinción hematoxilina como tinción de contraste.
15. Se deshidrataron los tejidos con la secuencia 95%, 80% y 50% etanol por 15 segundos, después 2:1 etanol: xilol, 1:1 etanol xilol, 100% xilol
16. Se realizó el montaje del corte con solución de montaje en cubreobjetos.

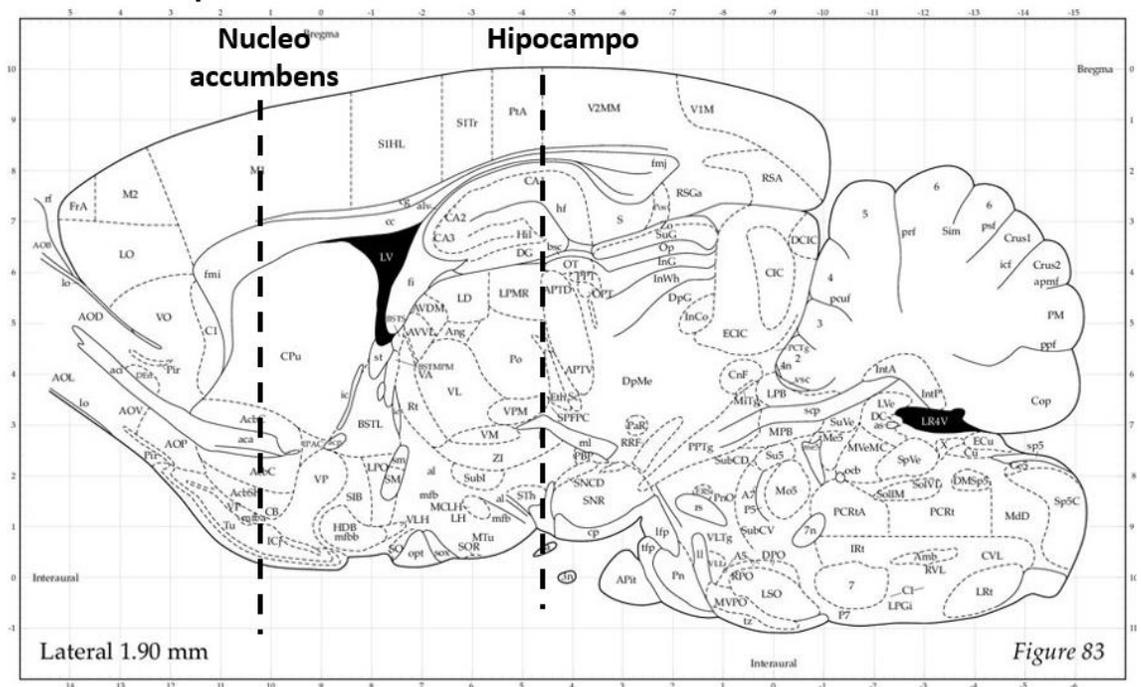


Figura 13. Representación de los sitios donde se realizaron los cortes coronales para realizar las inmunohistoquímicas. Imagen obtenida de Paxinos, George, and Charles Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online vía Elsevier, 2006.

6.3.10 Aislamiento de fracciones membranales y citoplásmicas de muestras de cerebro

1. De los modelos animales de los tres grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo de programación fetal (C-C, CAF-C y CAF-CAF), se aislaron las regiones de NAc, PFC e hipocampo con ayuda del atlas Paxinos.
2. Las regiones se incubaron en tampón de lisis que contiene: 150 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl pH 7,5, que contenía 50 mM de NaF₂, 10 mM de NaP₂O₇, 1 mM de ortovanadato de sodio, cóctel de inhibidor de proteasa completo y 0.5% de Tritón X-100 y se homogenizaron por sonicación (5 s a 1500 Hz en hielo)
3. La muestra se centrifugó durante 10 min x 1500 rpm y se determinó la concentración de proteínas mediante ensayo de Bradford como se describe a continuación.
4. El sobrenadante (3 mg de proteína en 500 µL por muestra) se incubó durante 30 min a 4 ° C y se centrifugó durante 20 min a 16,000 × ga 4 ° C, para separar un extracto soluble en Tritón y el sedimento insoluble.

Los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis y la concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford, siguiendo protocolos previamente publicados (Delint-Ramirez et al. 2015)

6.3.11 Determinación de concentración de proteínas por el ensayo de Bradford

1. Se realizó la curva de calibración de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 16 µg por triplicado en placa de 96 pozos (1 µL/pocillo)

2. Las muestras se midieron por triplicado colocando 1 μL por pocillo
3. Se añadió el reactivo de Bradford (BioRad) a los pocillos utilizando una pipeta multicanal con el volumen de 100 μL
4. Se realizó la lectura de la absorbancia de la placa a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placa (GloMax Discover Promega)
5. Finalmente, se calculó el volumen necesario para cargar 30 μg de proteína de cada muestra en el gel.

6.3.12 Western Blot

1. Las muestras se mezclaron con tampón Laemmli y se calentaron a 90 ° C durante 5 min y se sometieron a SDS-PAGE.
2. Se cargaron las muestras en geles preparados al 10 % de poliacrilamida
3. Se inició la electroforesis a 85 volts por 15 minutos y posteriormente se cambió el voltaje a 120 volts por 1 hora.
4. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa mediante cámara húmeda.
5. Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con Albúmina Bovina al 5% en tampón TBS-T (Tris 10 mM, NaCl al 0,9%, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 ° C con anticuerpos primarios: anticuerpo anti NMDA, anti-AMPA y anti Sinaptofisina (dilución 1:1000, 1:1000 y 1:500, respectivamente)
6. Las membranas se lavaron (4 veces x 5 min) en TBS-T, TBS (1 vez x 5 minutos) y se incubó con anticuerpo secundario conjugado con HRP (1:1000) durante 1 h.

7. Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia que fueron escaneados y cuantificados densitométricamente con el software ImageJ de 1.31 V (ChemiDoc XRS System BioRad)

CAPITULO 7

RESULTADOS

7.1 Pruebas Conductuales

7.1.1 La programación fetal de madres por dieta calórica modula el condicionamiento operante hacia recompensas naturales en la descendencia

En la primera serie de experimentos se determinó si la programación fetal por dietas hipercalóricas en la madre modulaba negativa o positivamente la motivación para obtener recompensas naturales en la descendencia. Para evaluar la motivación por recompensas, los grupos experimentales fueron sometidos al protocolo de condicionamiento operante empleando los esquemas FR1 y FR5, y PR, como se describió en la metodología. Es importante recordar que los modelos animales se clasificaron con motivación alta en aquellos que presionaron la palanca más de 10 veces en los protocolos FR1 y FR5, y más de 5 veces en el protocolo PR. Todos los sujetos que no compartían este criterio de inclusión se consideraron como sin motivación a la recompensa.

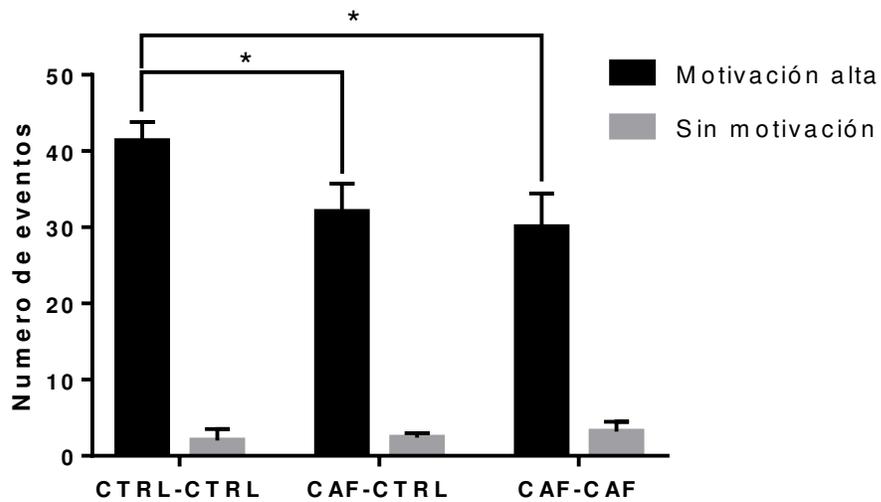


Figura 14. Comportamiento operante hacia recompensas naturales entre machos de los diferentes grupos de estudio (CTRL-CTRL, CAF-CTRL y CAF-CAF). El número de eventos (accionar de la palanca) se obtuvieron con el uso de la caja Skinner en el protocolo PR (1 hora x 5 días) donde se reta al animal a obtener su recompensa. Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni con $*p < 0.05 \pm \text{SEM}$ $n=16-19/\text{grupo}$).

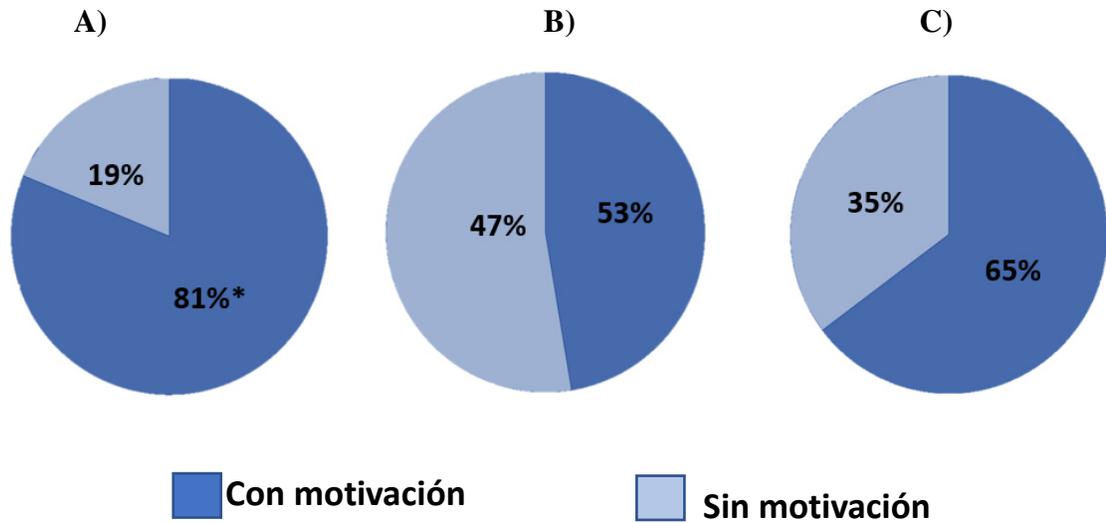


Figura 15. Grafica de pastel donde se observa los porcentajes de población de ratas con motivación hacia recompensas naturales y sin motivación por esta. Clasificadas en base al número de eventos obtenidos en PR. En el grupo A) CTRL-CTRL se observa que el 81% de ratas mostró motivación, sin embargo, en el grupo B), CAF-CTRL y C) CAF-CAF, se observa un menor porcentaje de población con resultados a favor de motivación (53 y 65%, respectivamente) (prueba Chi^2 con $*p < 0.05$ $n=16-19/\text{grupo}$).

Los resultados muestran que la exposición con dieta calórica durante el embarazo-lactancia (programación fetal) y posterior al destete decrece el comportamiento motivante en la obtención de recompensas naturales durante el protocolo PR, cuando se compara con la descendencia de madres expuestas a dieta control, (grupo CAF-CAF vs CTRL-CTRL) (Figura 14). De interés, la programación fetal por dieta calórica es capaz de inducir el mismo fenotipo conductual en la descendencia (grupo CAF-CTRL vs CTRL-CTRL) (Figura 14 y 15). Además, al realizar el análisis de la población total se observa una disminución en el porcentaje de la población con una respuesta motivada elevada por parte de los grupos CAF-CTRL 53 % y CAF-CAF 65 % en comparación con el grupo control (Chi^2 $p < 0.05$) (Figura 15). Por lo anterior, el estímulo de programación fetal por dieta hipercalórica disminuye la capacidad de motivación por recompensas naturales en la población.

7.1.2 Evaluación de un comportamiento similar a la anhedonia mediante la prueba de preferencia a la sacarosa

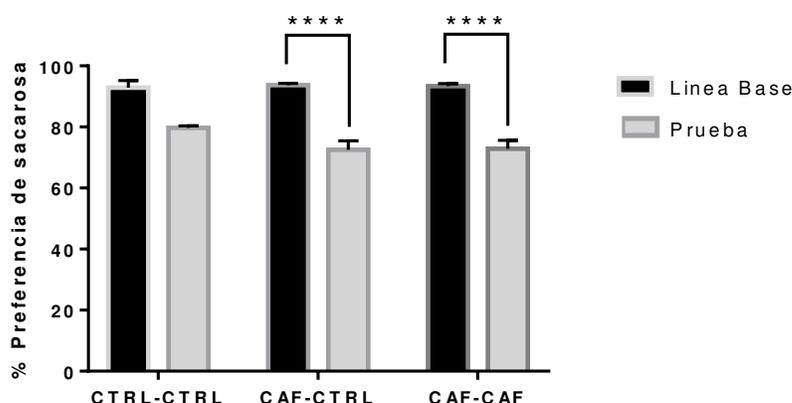


Figura 16. Comparación del porcentaje de preferencia a la ingesta de sacarosa (%PS). Las ratas se alojaron en cajas individuales y se registró la ingesta basal de sacarosa (línea base). El consumo de sacarosa por 20 minutos fue medido después de privación alimenticia de 16 horas y comparado con el consumo habitual (línea base) entre los grupos de estudio. (ANOVA post hoc Tukey ** $p < 0.0001$ + SEM $n=6-12$ /grupo).**

Posteriormente, nos interesó identificar evidencias adicionales que pudieran explicar el decremento en la conducta motivante de la descendencia inducido por la programación fetal. Se emplearon tres pruebas: la prueba de preferencia a la sacarosa, la prueba de alimentación novedosa suprimida y la prueba de campo abierto, como se describió en la sección de métodos. Los resultados correlacionan con el decremento en motivación identificado durante la prueba de condicionamiento operante, confirmado por la disminución en el porcentaje de ingesta de sacarosa (% PS) en los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF, comparado con la ingesta basal en sesiones previas comparado con la ingesta que presenta el grupo CTRL-CTRL (Figura 17), el cual es ampliamente utilizado como indicativo de un comportamiento similar a la anhedonia relacionada a trastorno depresivo (Mateus-Pinheiro et al. 2014)

7.1.3 Evaluación de un comportamiento semejante a la ansiedad mediante prueba de alimentación novedosa suprimida

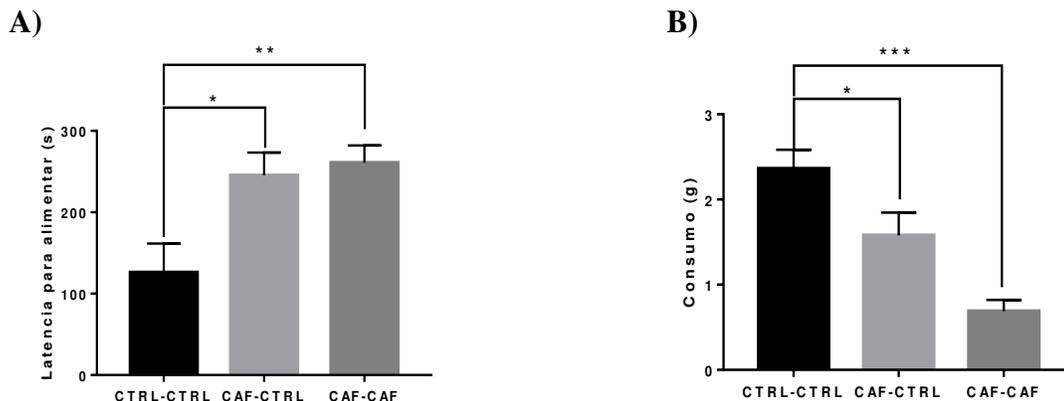


Figura 17. Identificación de un comportamiento similar a la ansiedad como efecto de la programación fetal. El tiempo que le tomó al modelo alcanzar su alimento fue después de una privación de alimento y agua por 18 horas, y posterior a ser alcanzado se midió el consumo de alimento en su jaula individual por 20 minutos. A) Comparación de los promedios del tiempo requerido para alcanzar el alimento del centro de la arena, observándose un mayor tiempo en los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF en comparación con el grupo Control (ANOVA post hoc Bonferroni * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ + SEM $n = 6-12$ /grupo); B) Comparación de los promedios del consumo de alimento en su jaula habitual. Se observa disminución del consumo en los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF en comparación con el grupo Control (ANOVA post hoc Bonferroni *** $p < 0.001$ + SEM $n = 6-12$ /grupo).

En la siguiente serie de experimentos, se empleó la prueba de alimentación suprimida novedosa para identificar comportamientos semejantes a la ansiedad relacionada a depresión. Los resultados indican que la descendencia de madres expuestas a dieta CAF durante el embarazo-lactancia o la exposición después del destete, invierte un mayor tiempo para alcanzar el alimento en el centro de la arena, cuando se compara con sujetos control (grupos CAF-CTRL y CAF-CAF vs CTRL-CTRL) (Figura 17). Además, la programación fetal por dieta o bien después del destete induce decremento en el consumo de alimento en cajas individuales en comparación con el grupo control. Por lo anterior, estos datos proponen que la descendencia de los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF, presentan un comportamiento similar a la ansiedad.

7.1.4 Evaluación de comportamiento semejante a la ansiedad mediante prueba de campo abierto

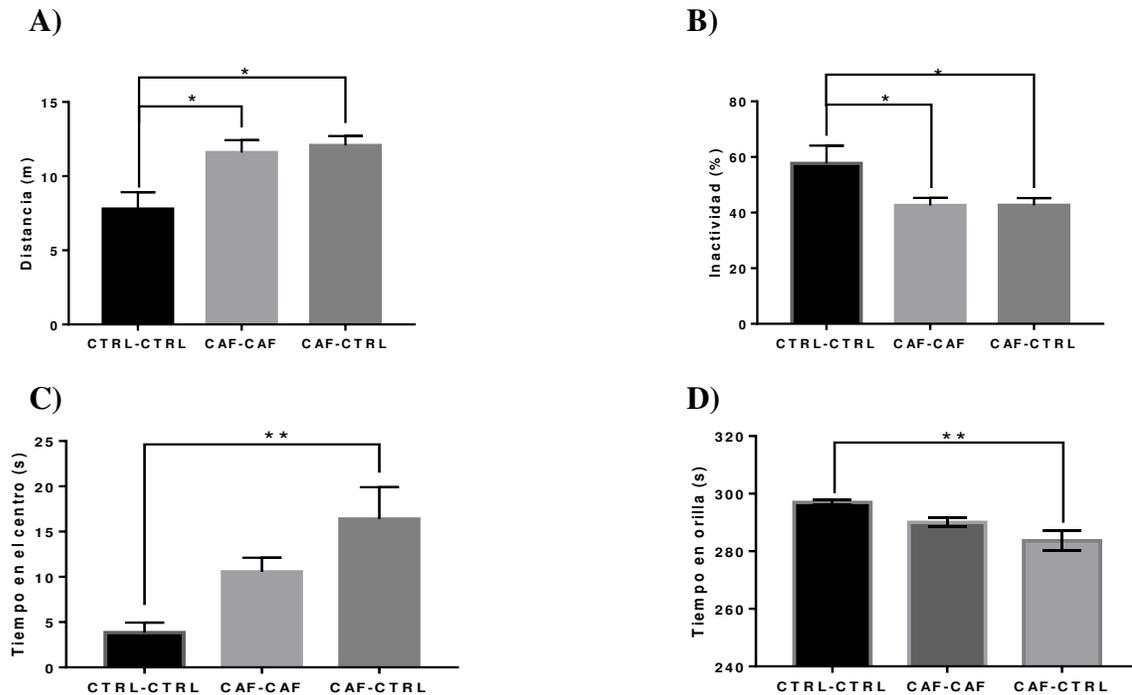


Figura 18. Graficas de barras del comportamiento de las ratas en la prueba de campo abierto, correspondiendo A) la comparación de distancia total recorrida, B) el porcentaje de inactividad de las ratas durante la prueba. Comparación de los promedios del tiempo de las ratas manteniéndose en C) el centro y D) en las orillas de la arena (ANOVA post hoc Tukey ** p<0.01 + SEM n=6-16/grupo).

Los resultados de la prueba de campo abierto muestran cambios significativos en la actividad locomotora aumentada y menor tiempo de inactividad por parte de la descendencia de los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF, en comparación al control (Figura 18 A y B, ANOVA p<0.01). Además, los modelos exhibieron mayores tiempos en el centro de la arena y menores en las orillas (Figura 18 C y D). Los datos obtenidos por la prueba de alimentación suprimida novedosa indican un comportamiento de ansiedad.

7.2 Evaluación de cambios microestructurales por efecto de programación fetal

Posteriormente, con la finalidad de evaluar los cambios microestructurales inducidos por efecto de la programación fetal, se analizaron integrantes de la plasticidad sináptica mediada por glutamato mediante técnicas de western blot e inmunohistoquímica en regiones involucradas en la obtención de la recompensa (Hipocampo, NAc y PFC). Para la primera técnica, se utilizaron marcadores del sistema glutamatérgico, siendo estos la subunidad de los receptores ionotrópico NMDA (subunidad NR1) y AMPA (subunidad GluR1 y GluR2). Adicionalmente, se evaluó un marcador sináptico importante asociada a la vesícula sináptica, utilizada comúnmente como una estimación del número de sinapsis funcionales involucradas en la neurotransmisión, que dictaminará una alteración en la respuesta sináptica eficiente dentro del efecto del estímulo programación fetal y dieta.

7.2.1 Identificación de proteínas sinápticas por Western blot

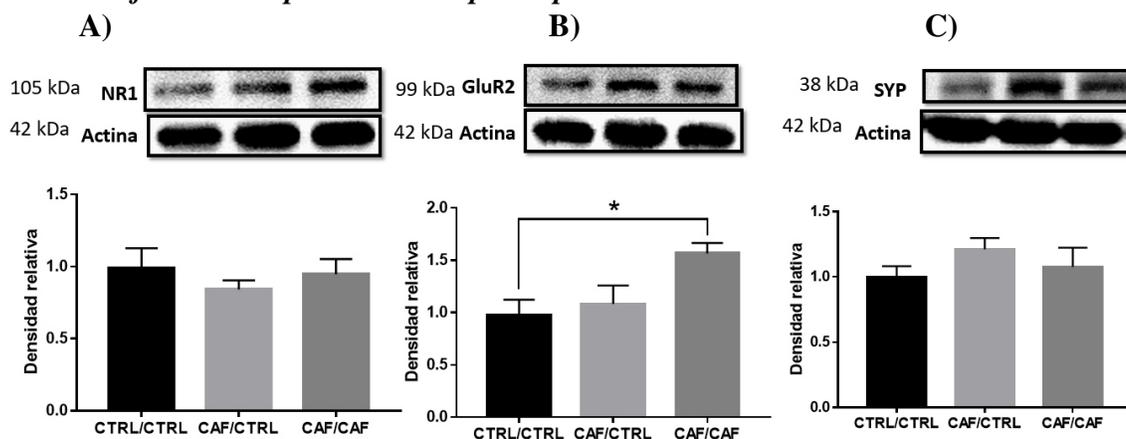


Figura 19. Graficas de barras de los niveles de proteína de la región del hipocampo. A-C) Western blot representativo mostrando las proteínas NMDA, y Sinaptofisina (SYP), respectivamente, en la región del Hipocampo de las ratas en los grupos de estudio. La densidad de bandas obtenidas para A) CTRL-CTRL, B) CAF-CTRL y C) CAF-CAF, fueron estandarizadas por actina y representadas como densidad relativa de las condiciones del control. Se observa diferencia estadísticamente significativa la cantidad de proteína de GluR2 respecto al grupo CAF-CAF (ANOVA post hoc Tukey $*p < 0.05$ + SEM $n = 5-8$ /grupo).

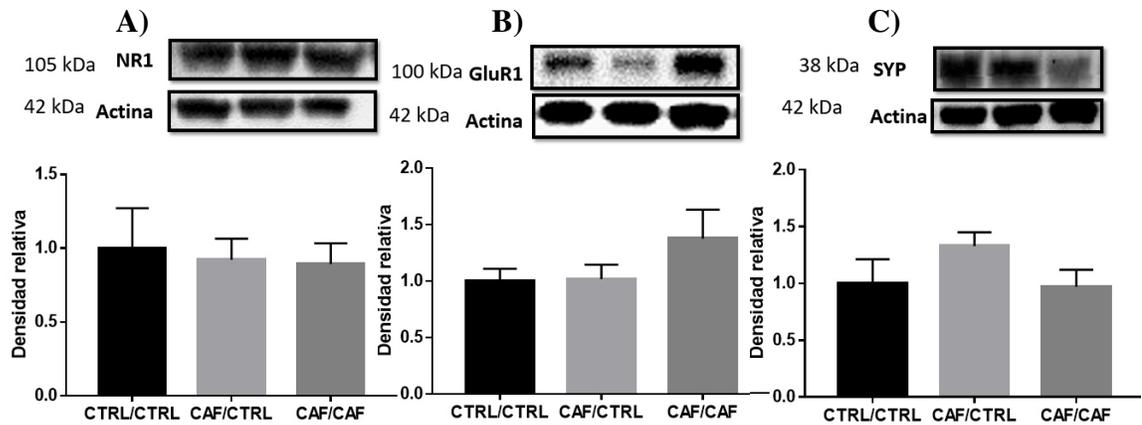


Figura 20. Graficas de barras de los niveles de proteína de la región corteza prefrontal. Western blot representativo mostrando las proteínas NMDA, AMPA (subunidades NR1, GluR1, respectivamente) y Sinaptofisina (SYP) en la región de la corteza prefrontal de las ratas en los grupos de estudio. La densidad de bandas obtenidas para A) CTRL-CTRL, B) CAF-CTRL y C) CAF-CAF, fueron estandarizadas por actina y representadas como densidad relativa de las condiciones del control. A pesar de no observarse alguna diferencia estadísticamente significativa en los grupos, se observa una tendencia en aumento de GluR1 en el grupo de CAF-CAF. (ANOVA post hoc Tukey * $p < 0.05$ + SEM $n = 5-8$ /grupo).

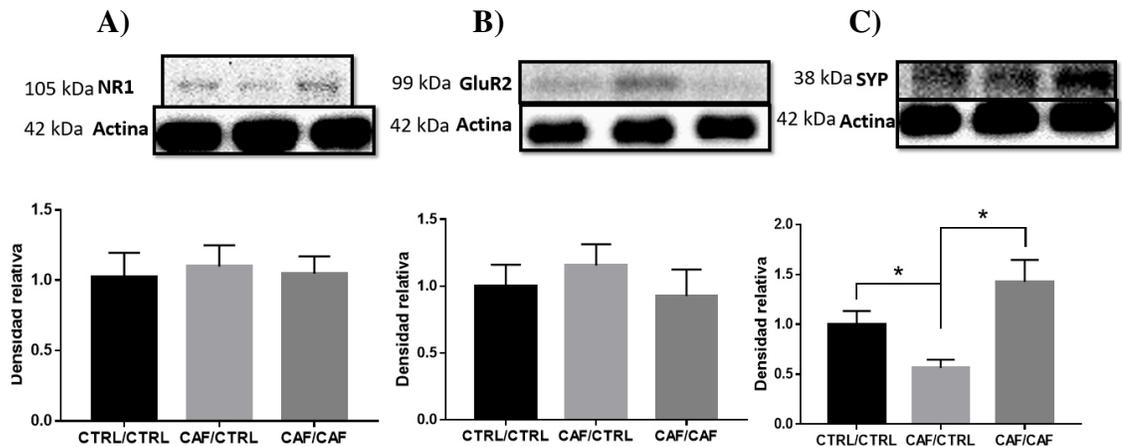


Figura 21. Graficas de barras de los niveles de proteína de la región núcleo accumbens. Western blot representativo mostrando las proteínas NMDA, AMPA (subunidades NR1, GluR2, respectivamente) y Sinaptofisina (SYP) en la región de núcleo accumbens de las ratas en los grupos de estudio. La densidad de bandas obtenidas para A) CTRL-CTRL, B) CAF-CTRL y C) CAF-CAF, fueron estandarizadas por actina y representadas como densidad relativa de las condiciones del control. Las ratas provenientes de programación fetal (CAF-CTRL), mostraron bajos niveles de proteína SYP, sin embargo, el grupo de programación fetal alimentado con cafetería (CAF-CAF) mostró niveles altos de SYP, ambos estadísticamente significativos (ANOVA post hoc Tukey * $p < 0.05$ + SEM $n = 5-8$ /grupo).

Como primera instancia en la evaluación de la microestructura de los modelos experimentales con alteraciones tipo depresivos, se observa un aumento de los niveles de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en la región de hipocampo de las ratas CAF-CAF con diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (Figura 19B). Sin embargo, no se observa alguna diferencia en los niveles de las demás proteínas (NMDA y Syp, Figura 19 A y C). Por otro lado, a pesar de no observarse alguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de proteínas analizadas en la región de PFC (20 A y C), se puede observar una tendencia aumentada de la cantidad de GluR1 en las ratas CAF-CAF (Figura 20B). Por último, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de NR1 y mGluR2 (Figura 21 A y B) entre los grupos en la región del NAc, sin embargo, existe una mayor cantidad de Syp en el NAc de las ratas provenientes del grupo CAF-CAF y menor cantidad de Syp en el NAc de las ratas provenientes del grupo CAF-CTRL con diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (Figura 21C).

7.2.2 Identificación de proteínas sinápticas por inmunohistoquímica

Adicionalmente, en esta serie de experimentos identificamos alteraciones del marcador de sinapsis, sinaptofisina en nuestros modelos de programación fetal. En primera instancia, estandarizamos la dilución de los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunohistoquímica para sinaptofisina. En esta etapa empleamos controles positivos de expresión que correspondían a intestino y páncreas (Figura 22 C, D) y negativo para ausencia de anticuerpo en hipocampo (Figura 22 B).

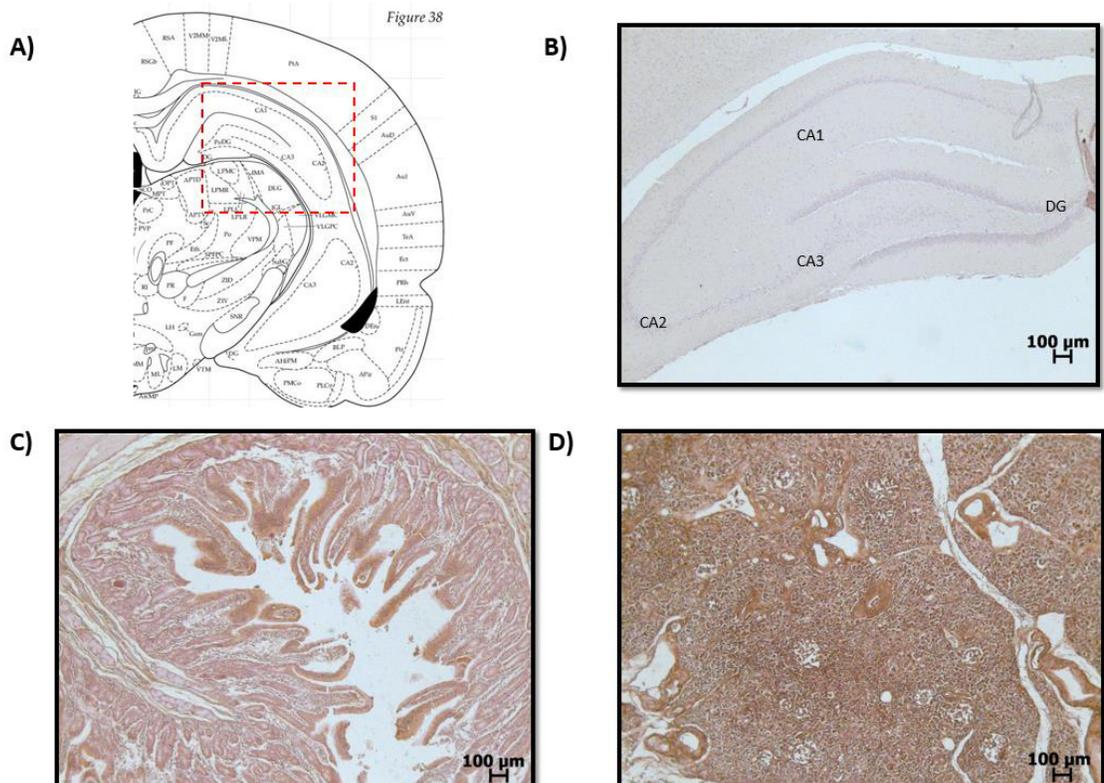


Figura 22. Representación de imágenes de los controles utilizados en la técnica de inmunohistoquímica. Imágenes representativas mostrando A) la región ubicada del hipocampo referente a la imagen del control negativo; B) control negativo con una inmunoreacción negativa para Sinaptofisina (SYP) en la región hipocampo de corte coronal de cerebro de rata; C) Control positivo con una inmunorreacción positiva para Syp en células neuroendócrinas de un corte de intestino de rata en la periferia de la luz intestinal y; D) Control positivo con reacción positiva para Syp en células exocrinas de un corte de páncreas. La inmunohistoquímica se llevó a cabo con el anticuerpo SYP 1:200 siguiendo las condiciones del fabricante.

Los resultados de programación con dieta de CAF muestran decremento de la expresión de sinaptofisina en la región del NAc (grupo CAF-C) referente a niveles control, representados solo por apreciación en la inmunoreacción del anticuerpo SYP en áreas de la región del NAC (Figura 23 A y B). De interés, la programación por CAF y

exposición de la misma dieta después del destete (grupo CAF-CAF) incrementa los niveles del marcador sinaptofisina en la misma región, observándose una inmunoreacción más pronunciada, representado por un color café más abundante en los cortes presentados en las figuras (Figura 23 A y C).

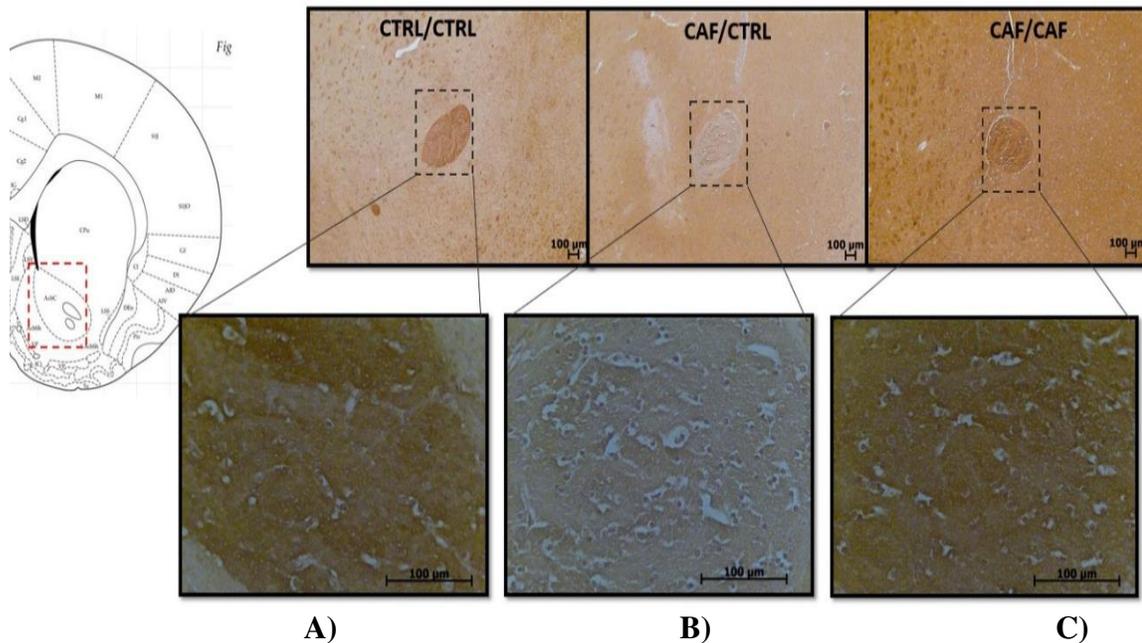


Figura 23. Representación de los resultados de la inmunohistoquímica de SYP en la NAc. Imágenes representativas mostrando inmunoreacción de Sinaptofisina (SYP) en la región de núcleo accumbens de las ratas en los grupos de estudio. La inmunohistoquímica se llevó a cabo con el anticuerpo SYP 1:200 siguiendo las condiciones del fabricante. Las ratas provenientes de A) Control; B) programación fetal CAF-CTRL, mostraron baja inmunoreacción de SYP, sin embargo, el grupo de programación fetal alimentado con cafetería C) CAF-CAF mostró alta inmunoreacción de SYP, ambos resultados correlacionan con lo encontrado en Western blot descrito anteriormente.

En base a la apreciación de las imágenes obtenidas por la técnica de inmunohistoquímica, se puede observar una inmunoreacción contra la Syp muy intensa en la región del Nac en el grupo de CAF-CAF (Figura 23 C) y una carente inmunoreacción contra Syp en el Nac de la descendencia CAF-CTRL. Estos datos

correlacionan con los resultados obtenidos por western blot en el presente estudio (Figura 21 C), donde se puede confirmar una disminución de Syp en el NAc del grupo CAF-CTRL y un aumento de esta en el grupo CAF-CAF, en comparación con el grupo control.

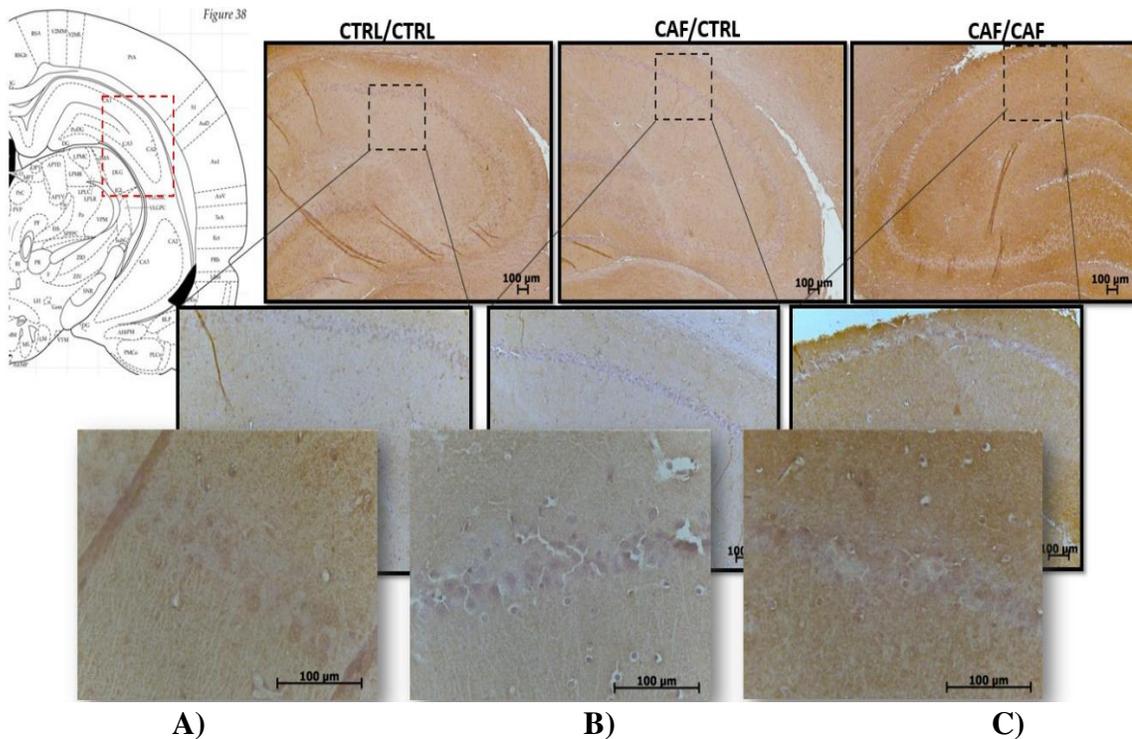


Figura 24. Representación de los resultados de la inmunohistoquímica de SYP en subcampo CA1 de la región del hipocampo. Imágenes representativas mostrando inmunoreacción de Sinaptofisina (SYP) en la región del hipocampo de las ratas en los grupos de estudio. La inmunohistoquímica se llevó a cabo con el anticuerpo SYP 1:200 siguiendo las condiciones del fabricante. Los tejidos provenientes de las ratas del grupo B) CAF-CAF mostraron células con presencia de picnosis, además de una desorganización celular a nivel de CA1, al igual que las ratas del grupo C) CAF-CTRL, sin embargo, estas últimas mostraron además una inmunoreacción disminuida para SYP.

Dentro de la región del hipocampo, nos enfocamos en examinar el subcampo CA1, donde se puede observar una mayor inmunoreacción de Syp en el tejido perteneciente al grupo CAF-CAF (Figura 24 C), sin embargo, se aprecian células con presencia de picnosis, además de una desorganización celular generalizada por el

subcampo CA1 y una delgada capa celular en la misma. Adicionalmente, como resultado del grupo CAF-CTRL, se puede apreciar un redondeamiento de los núcleos y una desorganización celular, sin embargo, en este grupo se encontró una menor inmunoreacción de Syp representada por la disminución de inmunoreacción, dando un color menos intenso en comparación con el grupo CAF-CAF y C-C (Figura 24 B).

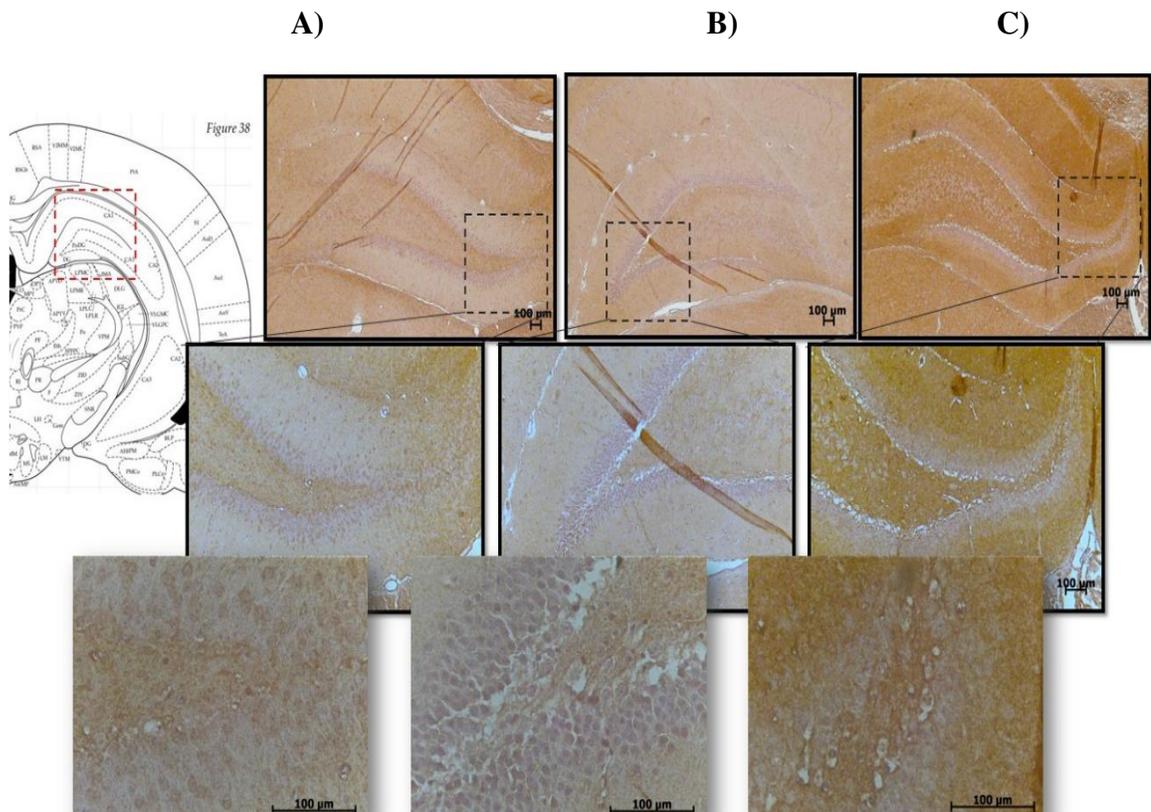


Figura 25. Representación de los resultados de la inmunohistoquímica de SYP en giro dentado de la región del hipocampo. Imágenes representativas mostrando inmunoreacción de Sinaptofisina (SYP) en la región del hipocampo de las ratas en los grupos de estudio. La inmunohistoquímica se llevó a cabo con el anticuerpo SYP 1:200 siguiendo las condiciones del fabricante. Se observaron núcleos bien delimitados además de una inmunoreacción similar entre los grupos A) CTRL-CTRL y B) CAF-CTRL, sin embargo, en el giro dentado correspondiente al grupo C) CAF-CAF, se observaron picnóticos además de una inmunorreacción muy abundante para SYP en comparación con los otros grupos de estudio.

Por último, se puede apreciar el subcampo de giro dentado dentro de la región del hipocampo de los distintos grupos de estudio. En la imagen perteneciente al grupo CAF-CTRL (Figura 25B), se observa una buena delimitación celular a lo largo del

subcampo, con núcleos redondeados picnóticos y una inmunorreacción semejante al control. En cambio, para el grupo CAF-CAF, se aprecia una intensa inmunorreacción de Syp, una notable desorganización celular y baja densidad celular (Figura 25 C) en comparación con el control.

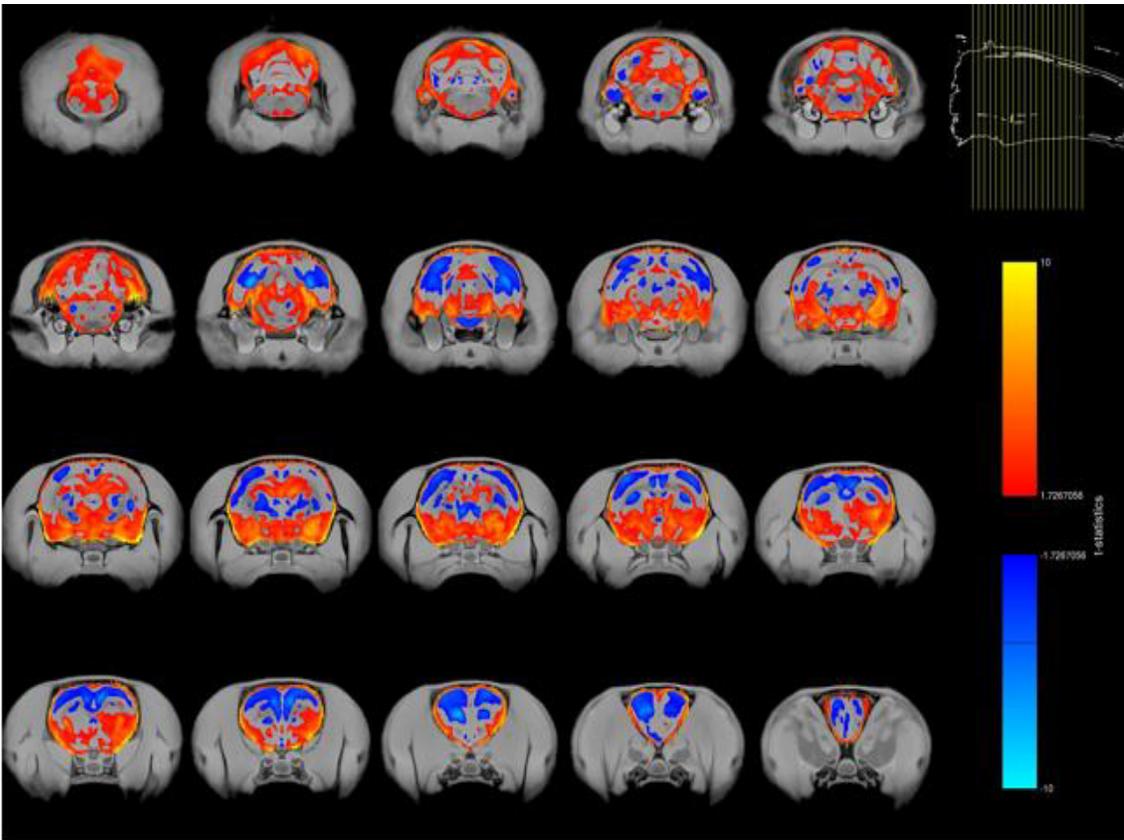
7.3 Evaluación de cambios macroestructurales por efecto de programación fetal

En la última fase de experimentos empleamos imagen de resonancia magnética con la finalidad de identificar cambios macroestructurales del cerebro, ejercidos por la programación fetal por dietas hipercalóricas y los mostrados en los sujetos con alteraciones en la conducta de motivación. Cabe señalar que todos los análisis estructurales de esta parte del proyecto se llevaron a cabo por el Dr. Eduardo Garza Villarreal, quien es codirector de la tesis y que cuenta con amplia experiencia en esta metodología de análisis.

Los resultados muestran que existen cambios en el tamaño de estructuras cerebrales entre los grupos control y CAF-CTRL. Estos cambios se extienden desde la parte más rostro-dorsal hasta la parte caudal-ventral del cerebro. Se pueden observar cambios en el volumen de las estructuras representados con los colores rojo (expansión) y azul (contracción). Los mayores cambios observados se enfocan en el incremento del volumen (Figura 26 A, B), al comparar únicamente la descendencia CAF-CTRL con el control. Interesantemente, los cambios de tipo expansión, se limitan a las regiones ventrales englobando al estriado, sin embargo, los cambios de tipo contracción se presentan en regiones dorsales, incluyendo en este último el hipocampo. Sin embargo, aun y con los parámetros incluidos en la obtención y análisis de las imágenes, no se

pudo identificar cambios específicos provenientes de la dieta, por lo que se deberán incluir parámetros adicionales, como lo son las fechas de entrenamientos y pesos. Aun así, se puede apreciar que existe una influencia importante en la macroestructura por parte de la exposición de dieta hipercalórica, sin embargo, para poder relacionarlo con una conducta específica se necesita de un análisis más minucioso.

A)



B)

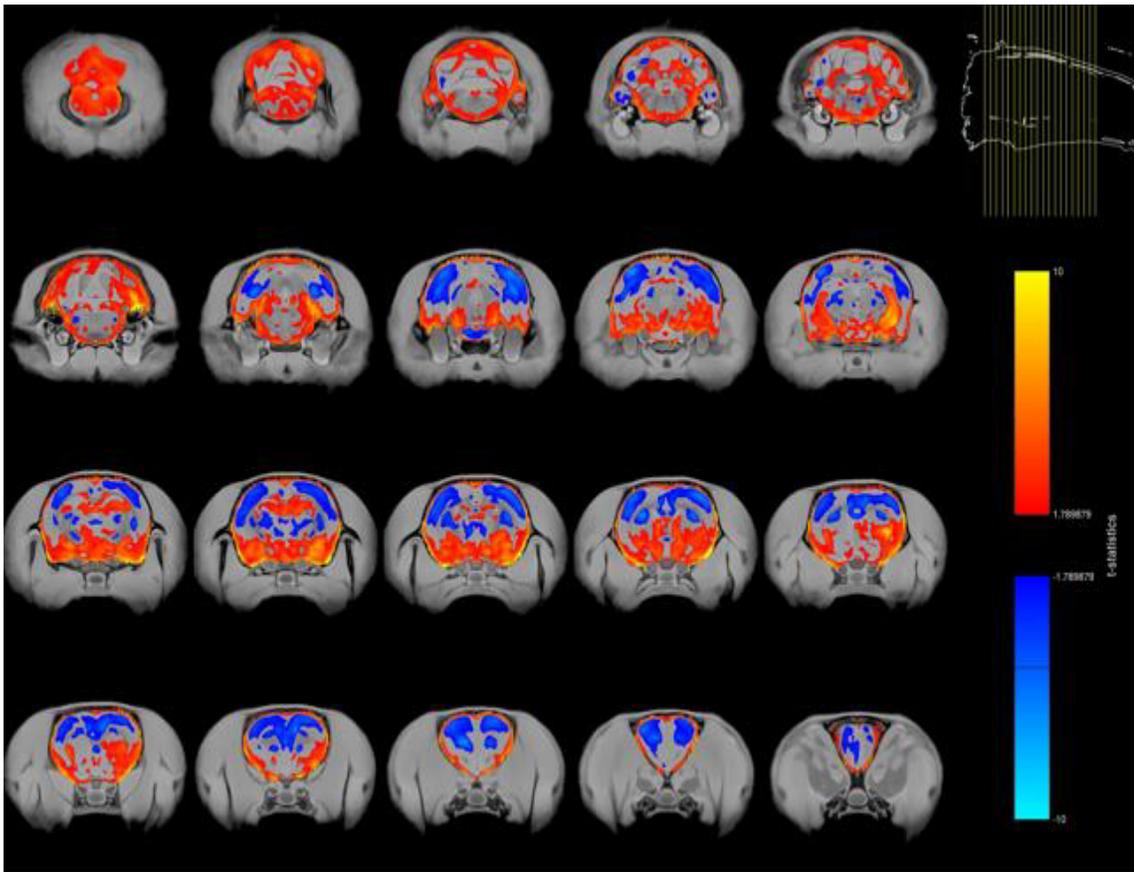
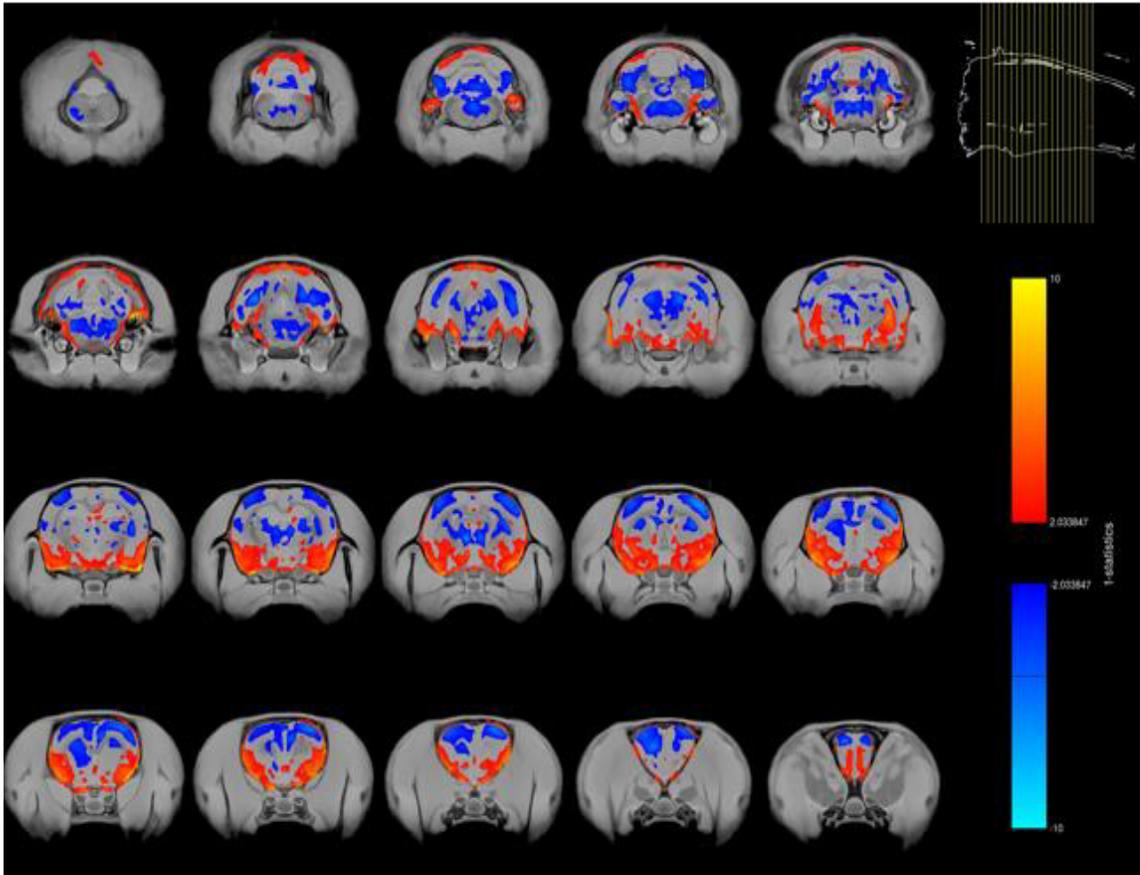


Figura 26. Imágenes representativas de la comparación de los volúmenes promedio de las estructuras cerebrales. La obtención de las imágenes fue mediante un resonador Bruker 7T 300 Mhz y fueron analizadas por morfometría basada en deformación comparando el volumen de las estructuras para evaluar las diferencias anatómicas relacionados con la exposición de la dieta. Se muestra la comparación de las imágenes promedio obtenidas del grupo A) CTRL-CTRL vs CAF-CTRL total y B) CTRL-CTRL vs CAF CTRL solo clasificadas con motivación elevada. Al excluir a los modelos con menor motivación (B), se conserva aun así la mayoría de los cambios en volumen (expansión/contracción), por lo que se requiere realizar una purga de datos mayor.

A)



B)

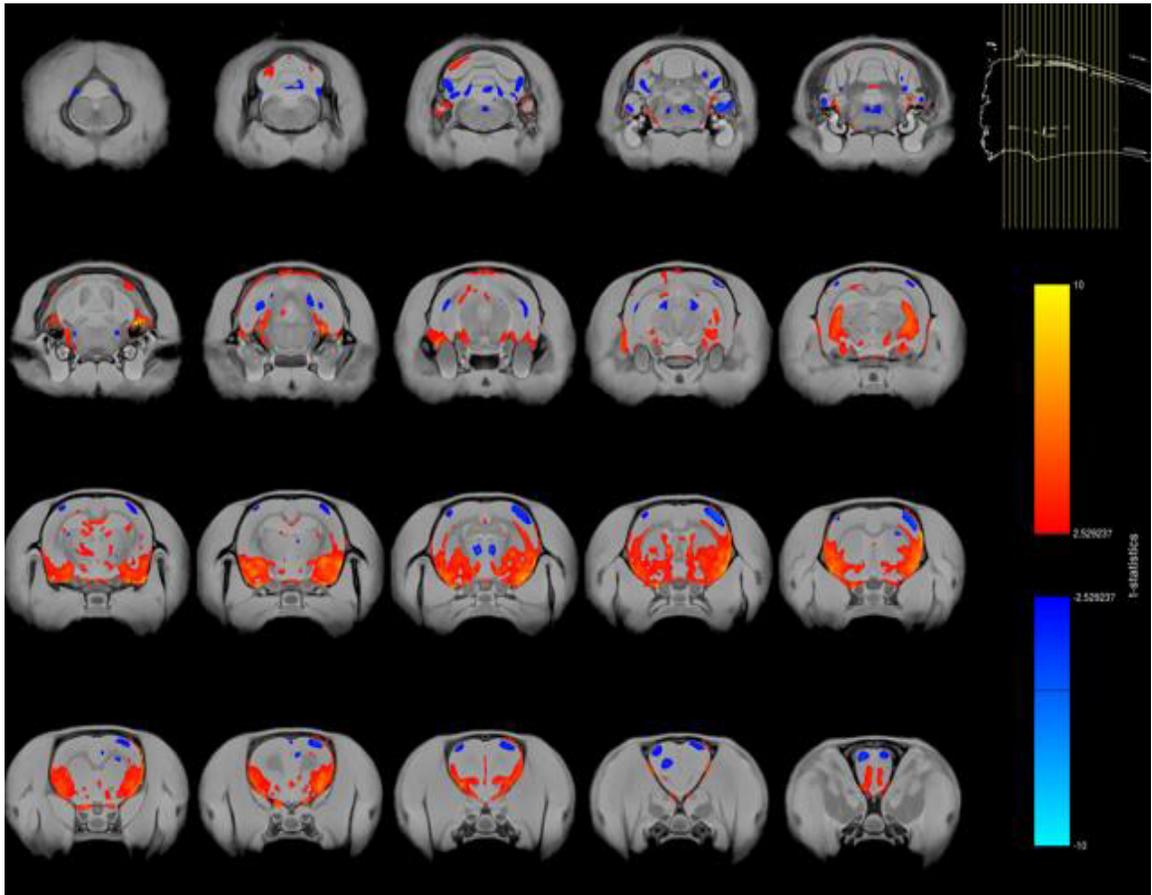


Figura 27. Imágenes representativas de la comparación de los volúmenes promedio de las estructuras cerebrales. La obtención de las imágenes fue mediante un resonador 7T Bruker y fueron analizadas por morfometría basada en deformación comparando el volumen de las estructuras para evaluar las diferencias anatómicas relacionados con la exposición de la dieta. Se muestra la comparación de las imágenes promedio obtenidas del grupo A) CTRL-CTRL vs CAF-CAF total y B) CTRL-CTRL vs CAF CAF solo clasificadas con motivación elevada. Al excluir a los modelos con menor motivación (B), se observa una disminución de las señales con cambios en volumen, quedando en su mayoría de tipo expansión (aumento de volumen representado con rojo) preservándose principalmente en regiones ventrales del estriado y corteza orbitofrontal medial.

Al analizar las imágenes de la comparación del grupo control vs grupo CAF-CAF (Figura 27A), se puede apreciar menor número de cambios en comparación con los resultados del grupo CAF-CTRL (Figura 26A). Se observan cambios en su mayoría correspondientes a una disminución del volumen, involucrando principalmente el área

dorsal del hipocampo y área tegmental ventral; y aumento de volumen en región perteneciente al estriado incluyendo NAc. Adicionalmente, se puede apreciar un aumento de volumen en el área correspondiente a la Corteza Orbitofrontal medial (COFm), importante en el procesamiento cognitivo de la toma de decisiones. Sin embargo,

CAPITULO 8

DISCUSIÓN

Datos epidemiológicos en nuestra sociedad actual muestran la existencia de un alarmante incremento en el consumo de alimentos con alto contenido calórico. La evidencia experimental que en sus inicios sólo presentaba datos correlativos de marcadores patológicos con alteraciones en la ingesta de alimento, hoy en día nos dan información de un escenario más complejo en lo que respecta a su efecto en el desarrollo de daños colaterales semejantes a alteraciones en la función e integración del sistema nervioso. En este contexto, se sabe que el incremento en el consumo de alimentos con alto contenido se correlaciona con un mayor número de casos que presentan desordenes del comportamiento del tipo de depresión. Se ha propuesto que dichas alteraciones provienen de la exposición a dietas calóricas durante los períodos pregestacionales y gestacionales, que repercuten en el desarrollo del sistema nervioso y fomentan cambios en el comportamiento de la descendencia. Como ejemplo, estudios en humanos y en modelos animales han demostrado que la ingesta de dieta calórica en periodos críticos del desarrollo embrionario fomenta la aparición de conductas aberrantes en la descendencia semejantes a la anhedonia (Gueye et al., 2018; Peleg-Raibstein, Luca, & Wolfrum, 2012; Sullivan, Nousen, & Chamlou, 2013). Sin embargo, aún no se conoce con certeza la contribución del tipo de dieta calórica que modula selectivamente el desarrollo embrionario del sistema nervioso y la susceptibilidad a presentar conductas aberrantes, ni tampoco se conocen los cambios macro o microestructurales selectivos

para cada región cerebral y si su alteración puede ser potencialmente revertida por manipulaciones en la proporción de nutrimentos después del nacimiento. Para abordar estas interrogantes, en el presente estudio empleamos un modelo animal de programación fetal inducida por dieta hipercalórica (CAF) durante el periodo de pregestación, embarazo y lactancia, y evaluamos su efecto en el comportamiento y alteraciones selectivas del sistema nervioso irreversibles para fomentar fenotipos de alteración en la motivación en la descendencia.

La programación fetal por dieta CAF fomenta la conducta semejante a anhedonia en la descendencia

Inicialmente, el entrenamiento de la descendencia de ratas madres Wistar expuestas a programación fetal, nos permitió identificar dos poblaciones de sujetos con comportamiento selectivo a las recompensas, el grupo control exhibió una alta motivación (81 % de las ratas), mientras que los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF exhibieron una menor motivación por la obtención de recompensas naturales (53 y 65 %, respectivamente). Estos resultados correlacionan con lo reportado en la literatura empleando la prueba de condicionamiento operante en modelos con un fenotipo similar a la depresión inducidos por bebidas endulzantes, mostrando una disminución de la preferencia y la motivación para obtener recompensas dulces (Ahmed et al. 2010; Gueye et al. 2018) Por su parte, identificamos cambios selectivos del comportamiento motivante para obtener recompensas naturales (pellet de chocolate altamente gratificante) en los hijos de madres programadas con dieta calórica. En específico, madres expuestas a dieta CAF durante pregestación, embarazo y lactancia, y la posterior exposición de sus hijos

al mismo estímulo exhibe menor motivación por recompensas, en comparación con el control. De interés, los datos también muestran que el estímulo de programación fetal por dieta CAF es eficiente en generar decremento en motivación durante las etapas tempranas de vida, ya que la exposición de la descendencia a dieta control (CAF-CTRL), no recupera el fenotipo semejante a anhedonia identificado inicialmente. Nuestros datos iniciales sugieren la probable alteración del circuito mesocorticolímbico implicado en el procesamiento de las recompensas. Para verificar el decremento en la motivación, integramos pruebas conductuales adicionales que nos permitieron clasificar y obtener un diagnóstico más cercano del comportamiento que integra la anhedonia. La anhedonia es una característica del trastorno depresivo mayor, pero también es una característica de varios tipos de trastornos psiquiátricos y comportamientos desadaptativos. La , anhedonia se ha sugerido como un endofenotipo, entre los factores de riesgo y el desarrollo de la depresión (Arcego et al. 2018).. Nuestros resultados muestran que la descendencia de madres expuestas a dietas CAF (grupo CAF-CTRL), o bien, al exponer a la descendencia a dieta CAF posterior al destete (grupo CAF-CAF), presenta un decremento de la preferencia en el consumo de sacarosa comparado con el grupo control, a pesar de haber sido expuestas a ayuno prolongado de 16 h. Estudios han evidenciado la alteración de diversas regiones cerebrales implicadas en el circuito de la recompensa causadas por la exposición de alimento calórico de tipo azúcar durante etapas críticas de neurodesarrollo (Ahmed et al. 2010; Gueye et al. 2018), o bien alimento con alto contenido en grasa (Catirina et al. 2013), y correlacionan con un comportamiento semejante a la anhedonia. Además, la programación fetal con dieta CAF mostró ser un estímulo ansiogénico para la descendencia, ya que, dentro de los resultados de la prueba de alimentación suprimida novedosa, que identifica

comportamientos semejantes a la ansiedad/ relacionada a depresión, indican que la descendencia invierte un mayor tiempo para alcanzar el alimento en el centro de la arena, cuando se compara con sujetos control. Esta conducta también correlaciona con el decremento en el consumo de alimento en cajas individuales en comparación con el grupo control, sugiriendo un criterio adicional en el comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia, Nuestros datos correlacionan con lo reportado por Gueye, 2018, mostrando aumento en la latencia para alcanzar el alimento de ratas expuestas a sacarosa durante la adolescencia y con los reportados en modelos estándar de depresión inducida por tratamientos crónicos de estrés (Jiang et al. 2018). Interesantemente, nuestro estudio también demuestra que la programación de la descendencia por la exposición de la madre a dieta CAF es irreversible en el desarrollo del desarrollo de conducta motivante, ya que la exposición de la descendencia a dieta control después del destete no recupera los valores normales de actividad conductual. Con ello, estas alteraciones son potencialmente importantes en la integración neuronal durante el desarrollo embrionario y podrían predecir las psicopatologías de la descendencia en la adultez.

Finalmente, empleamos la prueba de campo abierto para evidenciar si el decremento en la motivación por alcanzar la recompensa en la descendencia, no se debe a defectos de locomoción y correlaciona con fenotipos de ansiedad. Nuestros resultados indican que la descendencia no presenta defectos en la actividad locomotora, sino por el contrario, se exhibe que los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF muestran aumento de actividad locomotora y menor tiempo de inactividad, además de mostrar mayor tiempo invertido en el centro de la arena respecto a las orillas. Por su parte, a pesar, de que estos

indicadores confirman lo contrario a un comportamiento similar a la ansiedad, en donde, se espera que el sujeto muestre mayor tiempo invertido en las esquinas de la arena, la literatura indica que cuando existe una diferencia en la capacidad locomotora de los modelos evaluados, los análisis posteriores, como las entradas de las zonas o el tiempo invertido en ciertas zonas designadas del campo, pueden estar sesgadas debido a la inactividad o tensión inducida por el tratamiento (Seibenhener and Wooten 2015), en nuestro caso la ingesta de dieta calórica. En este contexto, Sharma y colaboradores, 2013, demostraron que el consumo crónico de una dieta alta en grasa aumentó la ansiedad, el comportamiento depresivo, aumenta la respuesta hipotalámica-pituitaria-suprarrenal (HPA) al estrés. Con ello, es potencialmente probable que en nuestro modelo experimental exista la activación de mecanismos adicionales de regulación conductual vinculados al eje HPA y que están implicados en la modulación del estrés y el comportamiento de ansiedad.

Programación de alteraciones microestructurales en el cerebro de la descendencia por la exposición materna de dieta calórica

El glutamato es el neurotransmisor excitador primario en el SNC y actúa a través de dos clases principales de receptores: ionotrópico y metabotrópico. Mientras los receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA) son responsables de la transmisión sináptica excitatoria rápida, los receptores metabotrópicos (mGluRs) cumplen su papel a través de la modulación sináptica en todo el SNC. Con la finalidad de evaluar los cambios microestructurales inducidos por efecto de la programación fetal, se analizaron marcadores moleculares de plasticidad sináptica mediada por glutamato en la

modulación de la función del circuito mesocorticolímbico. Estudios previos muestran que la neurotransmisión glutamatérgica desempeñan un papel crucial en el desarrollo de comportamientos motivantes, en el contexto de adicción, anhedonia y despresión, y también está vinculado con la patogenia de trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés (Musazzi, Treccani, and Popoli 2013). En este contexto, se identificó que la programación fetal por dieta calórica induce incremento de la subunidad GluR2 del receptor AMPA (a-mino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato) en el hipocampo de ratas del grupo CAF-CAF con un comportamiento similar a la anhedonia-depresión. En otros estudios, han encontrado que la disminución de receptores AMPA con subunidad GluR1 (es decir, sin GluR2), en la membrana plasmática en el sistema de recompensa está asociado con la inducción de comportamiento similar a la depresión (Sekio and Seki 2014). Interesantemente, se ha demostrado que el estrés social crónico disminuye la expresión de la subunidad GluR1 de AMPAR en la región CA1 del hipocampo, con un decremento en el número y función de los receptores AMPA en sinapsis específicas (Schmidt et al. 2010). Por lo que, al tener AMPAR con subunidad GluR2 en nuestros modelos, es posible que exista una disruptación en el sistema glutamatérgico debido a el decremento de la función del receptor AMPA en el circuito de la recompensa.

Adicionalmente, la importancia de la transmisión glutamatérgica en la modulación del sistema mesocorticolímbico se evidencia en estudios previos demostrando un aumento de niveles de proteína mGluR 2/3 en modelos con trastorno depresivo mayor (Feyissa, Woolverton, and Karolewicz 2011; Kawasaki et al. 2011), y nuestro grupo ha demostrado incremento en su expresión en el NAc y la corteza prefrontal en la descendencia de ratas programadas con dieta CAF (Camacho et al.

2017) Dado que se sabe que GluR2 está implicado en la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica detectando el derrame de glutamato y reduciendo la liberación del transmisor (Chaki 2017), la expresión incrementada de la proteína GluR2 observada podría ser una consecuencia de niveles alterados de glutamato en cerebros de modelos con depresión. Por su parte, nuestros datos también reportan que no se observaron diferencias en los niveles de proteína de los marcadores de sinaptofisina a nivel de hipocampo y PFC. Mientras que se muestra un importante decremento en la expresión de sinaptofisina en el hipocampo de los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF, que correlaciona con incremento de la subunidad NR1 del receptor NMDA al menos en el grupo CAF-CAF. La sinaptofisina es un marcador sináptico importante asociada a la vesícula sináptica y comúnmente se emplea como un estimado del número de sinapsis funcionales involucradas en la neurotransmisión (Arcego et al. 2018). Nuestros resultados de marcaje de inmunoreactividad muestran que las ratas provenientes de programación fetal (CAF-CTRL), exhiben baja inmunoreacción de SYP, en contraste, el grupo de programación fetal alimentado con cafetería después del destete (CAF-CAF) mostró alta inmunoreacción de SYP, correlacionando estos resultados con lo obtenido por Western blot. El decremento en la marca de inmunoreactividad para sinaptofisina también se evidencia a nivel del área CA1 y giro dentado del hipocampo del grupo CAF-CTRL. Nuestros datos correlacionan con los de Arcego y colaboradores, 2018, demostrando disminución en el inmunocontenido de sinaptofisina en modelos animales estresados y en animales con exposición a dieta alta en grasa (W. Li et al. 2012). Sin embargo, cuando se asociaron los dos factores, el inmunocontenido de sinaptofisina se mantuvo similar al del grupo control. Aunque el grupo estresado y alimentado con dieta alta en grasa parece estar más protegido contra la depleción de sinaptofisina, el

comportamiento depresivo no se revirtió en estos animales. En nuestros resultados, podemos observar que los grupos CAF-CTRL y CAF-CAF, correlacionan con los cambios en los niveles de sinaptofisina en un modelo estresado o alimentado con dieta alta en grasa. Finalmente, identificamos que los cambios en la inmunoreactividad para sinaptofisina correlacionan con presencia de picnosis y desorganización celular, principalmente a nivel de CA1 y giro dentado del hipocampo. Lépinay y colaboradores, 2015, demostraron que ratas alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y lactancia mostraron disminución del número de neuronas recién nacidas en el hipocampo en la edad adulta. Estas alteraciones podrían participar de los efectos perjudiciales de la dieta en la memoria espacial (Lépinay et al. 2015), similares a los que muestran modelos animales expuestos a estrés crónico, presentando déficits conductuales evidenciados por presencia de anhedonia, deterioro de LTP, que correlacionan con la pérdida de expresión de SYP en el hipocampo (W. Li et al. 2012) Este último reporte correlaciona con lo identificado en la descendencia de madres expuestas a programación fetal por exposición a dieta CAF.

Programación de alteraciones macroestructurales en el cerebro de la descendencia por la exposición materna de dieta calórica

En la última fase de experimentos empleamos imagen de resonancia magnética basada en morfometría de deformación, con la finalidad de identificar cambios macroestructurales del cerebro adicionales a los previamente estudiados. Cabe señalar que todos los análisis de la macroestructura cerebral se llevaron a cabo por el Dr. Eduardo Garza Villarreal, del Instituto de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz, CDMX. Los análisis indican que la programación por dieta calórica induce en la

descendencia cambios notables en diversas estructuras cerebrales que se manifiestan tanto negativa como positivamente, dependiendo de la estructura analizada. En específico, la programación con dieta CAF (grupo CAF-CTRL), exhibe el mayor porcentaje de cambios de volumen, que incluyen la expansión y el decremento de estructuras, donde interesantemente los cambios de tipo expansión se limitan a las regiones ventrales englobando al estriado, mientras que los cambios de tipo contracción se presentan en regiones dorsales, incluyendo en este último al hipocampo. Por su parte, aunque menos dramático, el grupo CAF-CAF conserva gran número de las alteraciones exhibidas en el primer grupo, incluyendo cambios a nivel de la parte ventral del estriado y del hipocampo. De interés, cabe señalar que los cambios en el volumen cerebral corresponden a los sujetos que mostraron decremento en conducta motivante para recompensas naturales durante la prueba de condicionamiento operante. Reportes de estudios clínicos, han revelado la reducción del volumen total del cerebro y cambios en regiones cerebrales específicas, incluida la reducción del volumen en el hipocampo en pacientes sujetos con TDM (Ezzati et al. 2013). Además, estudios en humanos con depresión presentan disminución en el volumen del hipocampo (Vannier et al. 1996), que también se observa en roedores (Veena et al. 2011). Esta atrofia del hipocampo que está asociada con la depresión puede conducir a una reducción de la plasticidad cerebral y una disminución de los factores neurotróficos. De hecho, el decremento de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), correlaciona positivamente con incremento en la incidencia de depresión, con base a sus propiedades como molécula implicada en el crecimiento neurítico, la supervivencia celular y el fortalecimiento sináptico (Arcego et al. 2018). Además, esta disminución del volumen del hipocampo lo relacionan con una atrofia dendrítica en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Russo

and Nestler 2013). Los pacientes con depresión mayor tienen un volumen cortical más pequeño, incluido volumen reducido de materia blanca, en el COF y mPFC mediante análisis de imágenes de resonancia magnética en humanos (Val-laillet et al. 2015). Se cree que los cambios en el tamaño del PFC resultan, en parte, de la pérdida de las células gliales o de la atrofia neuronal que es necesario estudiar en tejido post mortem. Una repercusión de esto es que estos sean causa de las deficiencias en el sistema glutamatérgico, ya que se sabe que contribuyen en el proceso de transmisión glutamatérgica (Russo and Nestler 2013). Sin embargo, en este trabajo se puede apreciar que existen cambios de tipo atróficos (disminución de volumen) en áreas correspondientes a COF y PFCm, correlacionándolo con lo visto en estudios de modelos con depresión. Adicionalmente, los modelos de programación fetal que nunca ingirieron dieta alta en calorías mostraron cambios de volumen importantes en regiones cruciales que llevan el proceso de búsqueda y obtención de recompensas, los cuales son un aumento de volumen en el NAc, disminución de volumen en regiones del hipocampo y COF. Por lo que cambios semejantes a los ocurridos durante episodios depresivos, son adquiridos mediante programación fetal, sin existir aún así algún estímulo adicional, como lo es la dieta alta en calorías.

CAPITULO 9

CONCLUSIONES

En este estudio, se demostró la importancia de la programación fetal por nutrientes selectivos en el desarrollo de conductas aberrantes del tipo motivante. En específico, la exposición de madres a dieta hipercalórica induce decremento en la motivación para obtener recompensas naturales en la descendencia evidenciada por decremento motivante en la prueba de Skinner, del consumo de sacarosa y durante la prueba de alimentación suprimida. Estos datos sugieren la presencia de un comportamiento similar a la anhedonia en la descendencia.

La segunda conclusión importante de nuestro trabajo es que la conducta semejante a la anhedonia se correlaciona con cambios en la plasticidad sináptica del sistema glutamatérgico (GluR2) y microestructura sináptica (Syp) en estructuras del sistema de la recompensa. Estos cambios se evidencian por un incremento de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en la región del hipocampo y diferencias en el marcador sináptico Sinaptofisina entre los grupos de programación fetal y dieta CAF en la región del NAc Además, estos desordenes también pueden observarse en zonas del giro dentado y CA1 del hipocampo por inmunohistoquímica.

Finalmente, la exposición de madres a dieta hipercalórica induce en la descendencia alteraciones a nivel macroestructural evidenciadas por resonancia magnética que involucran cambios en diversas zonas del cerebro, en donde sobresalen el incremento en volumen del NAc y disminución de volumen en el hipocampo.

CAPITULO 10

REFERENCIAS

1. Abildgaard, A et al. 2014. “Chronic High-Fat Diet Increases Acute Neuroendocrine Stress Response Independently of Prenatal Dexamethasone Treatment in Male Rats.”
2. Ahmed, Serge H et al. 2010. “Sugar Overconsumption during Adolescence Selectively Alters Motivation and Reward Function in Adult Rats.” 5(2).
3. Alia-klein, Nelly et al. 2011. “Gene by Disease Interaction on Orbitofrontal Gray Matter in Cocaine Addiction.” *Arch Gen Psychiatry* 68(3): 283–94.
4. AN PAN. 2012. “Bidirectional Association Between Depression and Metabolic Syndrome.” *DIABETES CARE*, 35.
5. APA. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM- 5*. 5th ed. ed. America Psychiatric Association. Washington, DC.
6. Arcego, Danusa Mar et al. 2018. “Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats.” *Molecular Neurobiology* 55(4): 2740–53.
7. Ashburner, John, and Karl J Friston. 2003. “Morphometry.” In *Human Brain Function*,.
8. Bade, Aditya N., Howard E. Gendelman, Michael D. Boska, and Yutong Liu. 2017. “MEMRI Is a Biomarker Defining Nicotine-Specific Neuronal Responses

in Subregions of the Rodent Brain.” *American Journal of Translational Research* 9(2): 601–10.

9. Bai, Yunjing et al. 2014. “Complex Motivated Behaviors for Natural Rewards Following a Binge-like Regimen of Morphine Administration: Mixed Phenotypes of Anhedonia and Craving after Short-Term Withdrawal.” *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8(February): 1–14.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00023/abstract>.
10. Bale, Tracy L. 2015. “Epigenetic and Transgenerational Reprogramming of Brain Development.” *Nature reviews. Neuroscience* 16(6): 332–44.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25921815>.
11. Barazzoni, R et al. 2015. “Plasma Total and Unacylated Ghrelin Predict 5-Year Changes in Insulin Resistance.” *Clinical Nutrition*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.10.002>.
12. Becker, Alena et al. 2017. “Striatal Activation and Frontostriatal Connectivity during Non-Drug Reward Anticipation in Alcohol Dependence.” *Addiction Biology* 22(3): 833–43.
13. Breier, B. H. et al. 2001. “Fetal Programming of Appetite and Obesity.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 185(1–2): 73–79.
14. Bühler, Mira, and Karl Mann. 2011. “Alcohol and the Human Brain: A Systematic Review of Different Neuroimaging Methods.” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35(10): 1771–93.
15. Camacho, Alberto et al. 2017. “Obesogenic Diet Intake during Pregnancy Programs Aberrant Synaptic Plasticity and Addiction-like Behavior to a Palatable Food in Offspring.” *Behavioural Brain Research* 330(March): 46–55.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.014>.

16. Campbell, Stephanie, Michael Marriott, and Glenda M Macqueen. 2004. “Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering From Depression: A Meta-Analysis.” *(Am J Psychiatry 161: 598–607.*
17. Catirina, Paula et al. 2013. “Hypercaloric High-Lipid Diet and Brain Development: Effects on Cortical Spreading Depression in Adult Rats.” *Nutritional Neuroscience 16(6): 275–82.*
18. Cecchini, Michele et al. 2010. “Chronic Diseases: Chronic Diseases and Development 3 Tackling of Unhealthy Diets, Physical Inactivity, and Obesity: Health Effects and Cost-Effectiveness.” *The Lancet 376(9754): 1775–84.*
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61514-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61514-0).
19. Chaki, Shigeyuki. 2017. “mGlu2/3 Receptor Antagonists as Novel Antidepressants.” *Trends in Pharmacological Sciences 38(6): 569–80.*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.03.008>.
20. Chakravarty, M. 2018. “Neuroanatomical Phenotypes in Mental Illness: Identifying Convergent and Divergent Cortical Phenotypes across Autism, ADHD and Schizophrenia.” *Journal of Psychiatry and Neuroscience 43(3): 201–12.*
21. Chang, G.-Q., V. Gaysinskaya, O. Karatayev, and S. F. Leibowitz. 2008. “Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming: Increased Proliferation of Hypothalamic Peptide-Producing Neurons That Increase Risk for Overeating and Obesity.” *Journal of Neuroscience 28(46): 12107–19.*
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>.
22. Cobersonthebrain. “Students Comentary on Current Research in the Neurological

- Sciences.” <https://cobbersonthebrain.areavoices.com/> (June 10, 2018).
23. Coelho, Eduarda, Cristina Padez, Pedro Moreira, and Vitor Rosado Marques. 2013. “BMI and Self-Perceived Body Shape in Portuguese Children.” (August 2016).
24. Delint-Ramirez, Ilse et al. 2015. “Genetic Obesity Alters Recruitment of TANK-Binding Kinase 1 and AKT into Hypothalamic Lipid Rafts Domains.” *Neurochemistry International* 80: 23–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.11.002>.
25. Der-Avakian, Andre, and Athina Markou. 2012. “The Neurobiology of Anhedonia and Other Reward-Related Deficits.” *Trends in Neurosciences* 35(1): 68–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.005>.
26. Duman, Ronald S., George K. Aghajanian, and John H. Krystal. 2016. “Synaptic Plasticity and Depression: New Insights from Stress and Rapid-Acting Antidepressants.” *Nat Med* 22(3): 238–49.
27. Ezzati, Ali, Molly E M E Zimmerman, Mindy J M J Katz, and Richard B R B Lipton. 2013. “Hippocampal Correlates of Depression in Healthy Elderly Adults.” *Hippocampus* 23(12): 1137–42. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.22185/full>.
28. Faith, M S et al. 2011. “Evidence for Prospective Associations among Depression and Obesity in Population-Based Studies.” (11): 438–53.
29. Feyissa, Anteneh M., William L. Woolverton, and Beata Karolewicz. 2011. “Elevated Level of Metabotropic Glutamate Receptor 2/3 in the Prefrontal Cortex in Major Depression.” *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(2): 279–83.

30. Fowler, Joanna S, Nora D Volkow, Cheryl A Kassid, and Linda Chang. 2007. "Imaging the Addicted Human Brain." *Science & Practice Perspectives* 3(2): 4–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2851068/>.
31. Franklin, Teresa R et al. 2002. "Decreased Gray Matter Concentration in the Insular , Cocaine Patients." *Society of Biological Psychiatry* 3223(1).
32. Gaser, Christian et al. 2001. "Deformation-Based Morphometry and Its Relation to Conventional Volumetry of Brain Lateral Ventricles in MRI." *NeuroImage* 13(6): 1140–45.
33. ———. 2012. "Deformation-Based Brain Morphometry in Rats." *NeuroImage* 63(1): 47–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.06.066>.
34. Gigliucci, Valentina et al. 2014. "Characterisation of the Antidepressant Properties of Nitric Oxide Synthase Inhibitors in the Olfactory Bulbectomised Rat Model of Depression." *European Neuropsychopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.05.003>.
35. Goldman, David, Gabor Oroszi, and Francesca Ducci. 2005. "REVIEWS THE GENETICS OF ADDICTIONS : UNCOVERING THE GENES." 6(July): 521–32.
36. Goldner, Limor, and Miri Levi. 2014. "The Arts in Psychotherapy Children ' S Family Drawings , Body Perceptions , and Eating Attitudes : The Moderating Role of Gender." *The Arts in Psychotherapy* 41(1): 79–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aip.2013.11.004>.
37. Gueye, Aliou B. et al. 2018. "Unlimited Sucrose Consumption during Adolescence Generates a Depressive-like Phenotype in Adulthood." *Neuropsychopharmacology* (January): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41386->

018-0025-9.

38. Heerwagen, M. J. R., M. R. Miller, L. A. Barbour, and J. E. Friedman. 2010. "Maternal Obesity and Fetal Metabolic Programming: A Fertile Epigenetic Soil." *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299(3): R711–22. <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00310.2010>.
39. Hopkins, Philip F. 2014. "NEUROBIOLOGY A Molecular Knife to Dice Depression Ultrafast Imaging Takes on a New Design." : 6–7.
40. Hsu, Jui-Sheng et al. 2017. "Altered Brain Correlates of Response Inhibition and Error Processing in Females with Obesity and Sweet Food Addiction: A Functional Magnetic Imaging Study." *Obes Res Clin Pract*. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871403X17300443>.
41. Huang, Yanhua H., and Yan Dong. 2016. "Silent Synapses Speak Up: Updates of the Neural Rejuvenation Hypothesis of Drug Addiction." *Neuroscientist*. 21(5): 451–59.
42. Hussain, Suleman et al. 2016. "SNARE Protein Syntaxin-1 Colocalizes Closely with NMDA Receptor Subunit NR2B in Postsynaptic Spines in the Hippocampus." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9(February): 1–13. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnmol.2016.00010/abstract>.
43. INEGI. 2015. "Encuesta Nacional de Los Hogares." *Salud mental*. <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/salud/>.
44. Isnard, Pascale et al. 2003. "Binge Eating and Psychopathology in Severely Obese Adolescents." *Int J Eat Disord* 34: 235–43.
45. Jiang, Ning et al. 2018. "Antidepressant Effects of Dammarane Sapogenins in Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depressive Mice." *Phytotherapy*

Research (January): 1–7.

46. Kalivas, P, and N Volkow. 2008. “New Medications for Drug Addiction Hiding in Glutamatergic Neuroplasticity.” *Growth (Lakeland)* 23(1): 1–7.
47. Kawasaki, Toshiyuki et al. 2011. “Increased Binding of Cortical and Hippocampal Group II Metabotropic Glutamate Receptors in Isolation-Reared Mice.” *Neuropharmacology* 60(2–3): 397–404.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.009>.
48. Kenny, Paul J, and George Bernard Shaw. 2011. “Review Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions.” *Neuron* 69(4): 664–79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.016>.
49. Knüppel, Anika, Martin J. Shipley, Clare H. Llewellyn, and Eric J. Brunner. 2017. “Sugar Intake from Sweet Food and Beverages, Common Mental Disorder and Depression: Prospective Findings from the Whitehall II Study.” *Scientific Reports* 7(1): 1–10.
50. Koob, George F, and Nora D Volkow. 2016. “Neurobiology of Addiction: A Neurocircuitry Analysis.” *The Lancet Psychiatry* 3(8): 760–73.
[http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8).
51. Kring, Ann M., and Deanna M. Barch. 2015. “The Motivation and Pleasure Dimension of Negative Symptoms: Neural Substrates and Behavioral Outputs.” *Eur Neuropsychopharmacol* 24(5): 725–36.
52. Lambert, Clare et al. 2018. “Anhedonia in Depression and Schizophrenia: A Transdiagnostic Challenge.” *CNS Neurosci Ther* 0(0): 1–9.
53. Lépinay, Amandine L et al. 2015. “Perinatal High-Fat Diet Increases Hippocampal Vulnerability to the Adverse Effects of Subsequent High-Fat

Feeding.” *Psychoneuroendocrinology* 53: 82–93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.12.008>.

54. Lerch, Jason P. et al. 2011. “Maze Training in Mice Induces MRI-Detectable Brain Shape Changes Specific to the Type of Learning.” *NeuroImage* 54(3): 2086–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.09.086>.
55. Lerch, Jason P., John G. Sled, and R. Mark Henkelman. 2011. “Magnetic Resonance Neuroimaging.” In *Magnetic Resonance Neuroimaging, Methods in Molecular Biology*, , 349–61.
56. Li, Wei et al. 2012. “Effects of Electroconvulsive Stimulation on Long-Term Potentiation and Synaptophysin in the Hippocampus of Rats with Depressive Behavior.” *Journal of ECT* 28(2): 111–17.
57. Li, Yuefeng et al. 2017. “Detection of Volume Alterations in Hippocampal Subfields of Rats under Chronic Unpredictable Mild Stress Using 7T MRI: A Follow-up Study.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 46(5): 1456–63.
58. Lu, Christian. 2011. “Review Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction : From Molecular Changes to Circuit Remodeling.”
59. Macedo, I. C. et al. 2015. “Chronic Stress Associated with Hypercaloric Diet Changes the Hippocampal BDNF Levels in Male Wistar Rats.” *Neuropeptides* 51: 75–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2015.01.002>.
60. Makris, Nikos et al. 2004. “Decreased Absolute Amygdala Volume.” *Neuron* 44: 729–40.
61. Mateus-Pinheiro, Ant3nio et al. 2014. “The Sweet Drive Test: Refining Phenotypic Characterization of Anhedonic Behavior in Rodents.” *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8(March): 1–10.

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00074/abstract>.

62. Matsuda, Hiroshi. 2016. "MRI Morphometry in Alzheimer's Disease." *Ageing Research Reviews* 30: 17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.01.003>.
63. Miladinovic, Tanya, Mina G Nashed, and Gurmit Singh. 2015. "Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies." *Biomolecules* 5: 3112–41.
64. Montoya, Iván D. 2008. "Redalyc.Inmunoterapias Para Las Adicciones a Las Drogas." 20: 111–15.
65. Musazzi, L, G Treccani, and M Popoli. 2013. "The Action of Antidepressants on the Glutamate System: Regulation of Glutamate Release and Glutamate Receptors." *Biol Psychiatry*. 73(12): 80–88.
66. Niero, Janaina et al. 2017. "The Impact of Obesity on Neurodegenerative Diseases." *Life Sciences* 182: 22–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.002>.
67. OECD. 2017. "Obesity Update 2017." www.oecd.org/health/obesity-update.htm.
68. Oestreich, Arin K, and Kelle H Moley. 2017. "Developmental and Transmittable Origins of Obesity-Associated Health Disorders." *Trends in Genetics* xx: 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2017.03.008>.
69. OMS, Organización Mundial de la Salud. 2016. "Obesidad Y Sobrepeso." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> (October 18, 2017).
70. Papazoglou, Ioannis K, Arnaud Jean, and Arieh Gertler. 2014. "Hippocampal GSK3 β as a Molecular Link Between Obesity and Depression."
71. Pasternak, Ofer, Sinead Kelly, Valerie J Sydnor, and Martha E Shenton. 2018. "Advances in Microstructural Diffusion Neuroimaging for Psychiatric Disorders." *NeuroImage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.04.051>.
72. Peleg-Raibstein, Daria, Edlira Luca, and Christian Wolfrum. 2012. "Maternal

- High-Fat Diet in Mice Programs Emotional Behavior in Adulthood.”
Behavioural Brain Research 233(2): 398–404.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.027>.
73. Portero-Tresserra, Marta et al. 2018. “Intra-Hippocampal D-Cycloserine Rescues Decreased Social Memory, Spatial Learning Reversal, and Synaptophysin Levels in Aged Rats.” *Psychopharmacology*: 1–15.
74. Ricciardi, Mario. 2018. “Principles and Applications of the Balanced Steady-State Free Precession Sequence in Small Animal Low-Field MRI.” *Veterinary Research Communications* 42(1): 65–86.
<http://link.springer.com/10.1007/s11259-017-9708-7>.
75. Rivera, Heidi M, Kelly J Christiansen, and Elinor L Sullivan. 2015. “The Role of Maternal Obesity in the Risk of Neuropsychiatric Disorders.” *Frontiers in Neuroscience* 9(194): 1–16.
76. Russo, Scott J, and Eric J Nestler. 2013. “The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders.”
77. Sarker, G et al. 2016. “Enhanced Sensitivity to Drugs of Abuse and Palatable Foods Following Maternal Overnutrition.” *Nature Publishing Group* 6(December 2015). <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2016.176>.
78. Sasaki, A. et al. 2014. “Maternal High-Fat Diet Alters Anxiety Behavior and Glucocorticoid Signaling in Adolescent Offspring.” *Neuroscience* 272: 92–101.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.012>.
79. Schmaal, L et al. 2016. “Subcortical Brain Alterations in Major Depressive Disorder: Findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder Working Group.” (October 2014): 806–12.

80. Schmidt, Mathias V et al. 2010. "Individual Stress Vulnerability Is Predicted by Short-Term Memory and AMPA Receptor Subunit Ratio in the Hippocampus." *The Journal of Neuroscience* 30(50): 16949–58.
81. Schwartz, Marlene B, and Kelly D Brownell. 2004. "Obesity and Body Image." 1: 43–56.
82. Scofield, M D et al. 2016. "The Nucleus Accumbens : Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis." 7288(July): 816–71.
83. Seibenhener, Michael L., and Michael C. Wooten. 2015. "Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice." *Journal of Visualized Experiments* (96): 1–6. <http://www.jove.com/video/52434/use-open-field-maze-to-measure-locomotor-anxiety-like-behavior>.
84. Sekio, Miyu, and Kenjiro Seki. 2014. "Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior Is Associated with α 1 -Adrenoceptor Dependent Downregulation of the Membrane GluR1 Subunit in the Mouse Medial Prefrontal Cortex and Ventral Tegmental Area." *International Journal of Neuropsychopharmacology*: 1–12.
85. Sharma, S., and S. Fulton. 2013. "Diet-Induced Obesity Promotes Depressive-like Behaviour That Is Associated with Neural Adaptations in Brain Reward Circuitry." *International Journal of Obesity* 37(3): 382–89. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2012.48>.
86. Sim, Minyoung E et al. 2007. "Cerebellar Gray Matter Volume Correlates with Duration of Cocaine Use in Cocaine-Dependent Subjects." *Neuropsychopharmacology* 32: 2229–37.

87. Spencer, Sarah J, and Zane B Andrews. 2015. "Diet-Induced Obesity Causes Ghrelin Resistance in Reward Processing Tasks." *Psychoneuroendocrinology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.004>.
88. Sullivan, Elinor L, Elizabeth K Nousen, and Katherine A Chamlou. 2013. "Physiology & Behavior Maternal High Fat Diet Consumption during the Perinatal Period Programs Offspring Behavior." *Physiology & Behavior*: 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.07.014>.
89. Thanos, Panayotis K. et al. 2016. "Chronic Methamphetamine Effects on Brain Structure and Function in Rats." *PLoS ONE* 11(6): 1–18.
90. Torres, Susan J., and Caryl A. Nowson. 2007. "Relationship between Stress, Eating Behavior, and Obesity." *Nutrition* 23(11–12): 887–94.
91. Tosun, Duygu et al. 2011. "Deformation-Based Morphometry of Prospective Neurodevelopmental Changes in New Onset Paediatric Epilepsy." *Brain A JOURNAL OF NEUROLOGY* 134(4): 1003–14.
92. Uys, Joachim D., and Kathryn J. Reissner. 2011. 98 Progress in Molecular Biology and Translational Science *Glutamatergic Neuroplasticity in Cocaine Addiction*. 1st ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385506-0.00009-0>.
93. Val-laillet, D et al. 2015. "NeuroImage: Clinical Neuroimaging and Neuromodulation Approaches to Study Eating Behavior and Prevent and Treat Eating Disorders and Obesity." *YNICL* 8: 1–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2015.03.016>.
94. Vannier, Michael W et al. 1996. "Hippocampal Atrophy in Recurrent Major Depression." 93(April): 3908–13.

95. Veena, J, B N Srikumar, K Mahati, and T R Raju. 2011. "Oxotremorine Treatment Restores Hippocampal Neurogenesis and Ameliorates Depression-like Behaviour in Chronically Stressed Rats." : 239–53.
96. Vickers, M H et al. 2000. "Fetal Origins of Hyperphagia, Obesity, and Hypertension and Postnatal Amplification by Hypercaloric Nutrition." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279(1): E83-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893326>.
97. Vyas, A, A G Pillai, and S Chattarji. 2004. "RECOVERY AFTER CHRONIC STRESS FAILS TO REVERSE AMYGDALOID NEURONAL HYPERTROPHY AND ENHANCED ANXIETY-LIKE BEHAVIOR." 128: 667–73.
98. Webber, Eleanor M. 2004. "The Journal of Psychology : Interdisciplinary and Applied Psychological Characteristics of Binging and Nonbinging Obese Women." *The Journal of Psychology* 128(3): 339–51.
99. Wheeler, A. L. et al. 2013. "Adolescent Cocaine Exposure Causes Enduring Macroscale Changes in Mouse Brain Structure." *Journal of Neuroscience* 33(5): 1797–1803. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3830-12.2013>.
100. WHO. 2018. "Depression." *WHO 2018*. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
101. Wiborg, Ove. 2013. "Chronic Mild Stress for Modeling Anhedonia." *Cell and Tissue Research* 354(1): 155–69.
102. Witte, A. Veronica et al. 2010. "Regional Sex Differences in Grey Matter Volume Are Associated with Sex Hormones in the Young Adult Human Brain."

NeuroImage 49(2): 1205–12.