

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR**



**MODULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ADICTIVO A LA COMIDA  
HIPERCALÓRICA POR LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE A  
INTERFERON DE TIPO I EN EL NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E  
INGENIERÍA GENÉTICA.**

**PRESENTA**

**LARISA JAJAIRA MONTALVO MARTÍNEZ**

**MONTERREY, N.L.**

**MARZO 2022**

**MODULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ADICTIVO A LA  
COMIDA HIPERCALÓRICA POR LA ACTIVACIÓN DE LA  
RESPUESTA INMUNE A INTERFERON DE TIPO I EN EL NÚCLEO  
ACCUMBENS DE RATAS**

**Aprobación de Tesis:**



---

**DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES**

Director de Tesis



---

**DRA. C. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA**

Co-Directora de Tesis



---

**DRA. C. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ**

Miembro de la Comisión de Tesis



---

**DRA. C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET**


Miembro de la Comisión de Tesis



---

**DR. C. ANTONIO ALI PÉREZ MAYA**

Miembro de la Comisión de Tesis



---

**DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**

Subdirector de Estudios de Posgrado

## ÍNDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	1
DEDICATORIA.....	2
FINANCIAMIENTO.....	3
ÁREA DE TRABAJO.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS .....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b> Adicción.....	
<b>2.2</b> La adicción a la comida: un problema de comportamiento aberrante y desregulación central de la ingesta de alimentos.....	15
<b>2.3</b> Programación fetal.....	19
<b>2.3.1</b> Mecanismos de regulación y herencia epigenética de las adicciones.....	19
<b>2.3.2</b> Herencia transgeneracional del fenotipo adictivo.....	21
<b>2.4</b> Efecto de la programación fetal por exposición a nutrientes hipercalóricos en el desarrollo y herencia del comportamiento adictivo en la descendencia.....	22
<b>2.5</b> Definición y función de la respuesta Inflamatoria.....	24
<b>2.5.1</b> Inflamación metabólica y su relación con trastornos cognitivos.....	25
<b>2.6</b> Papel de la activación de la respuesta a interferón tipo I en el desarrollo de conductas adictivas.....	27
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>

<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	35
i. Animales y mantenimiento.....	38
ii. Modelo de programación fetal con dieta de cafetería.....	38
iii. Prueba de condicionamiento operante.....	41
iv. Sacrificio y obtención de muestras.....	45
v. Aislamiento de RNA.....	45
a) Aislamiento de RNA de tejido.....	45
b) Aislamiento de RNA de cultivo celular.....	46
vi. PCR tiempo real (RTqPCR).....	47
vii. Cultivo celular de microglía y tratamientos.....	49
viii. Ensayo cualitativo de fagocitosis en microglía.....	50
ix. Ensayo cuantitativo de fagocitosis en microglía.....	51
x. Cuantificación de citocinas en plasma.....	51
xi. Cirugía estereotáxica.....	52
xii. Inyección central en la región del núcleo accumbens (NAc).....	53
xiii. Perfusión cardíaca.....	54
xiv. Inmunofluorescencia.....	54
xv. Análisis morfológico de la microglía.....	55
xvi. Modelo de herencia transgeneracional del comportamiento adictivo.....	55
xvii. Análisis estadístico.....	58
<b>VII. RESULTADOS</b>	59
i. Efecto de la exposición a dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia en el comportamiento adictivo hacia la comida de la descendencia (machos F1).....	
ii. La programación nutricional materna induce cambios morfológicos en la microglía que sugieren una activación y estado reactivo de la misma en el núcleo accumbens de la descendencia F1.....	61
iii. La programación nutricional materna induce la sobreexpresión del gen inducible por interferón tipo I (Ifit1) y citocinas pro-inflamatorias en el NAc de los machos F1 que muestran un comportamiento similar a la adicción a la comida.....	63
iv. La programación nutricional materna con dieta de cafetería induce inflamación periférica en la descendencia F1.....	65
v. El interferón alfa y el ácido palmítico inducen la activación de la vía de interferón de tipo I, que conlleva a la sobreexpresión de Ifit1 y citocinas pro-inflamatorias en la microglía.....	67

vi. El interferón alfa y ácido palmítico afectan la capacidad fagocítica de la microglía in vitro. ....	69
vii. El IFN $\alpha$ modula la activación de la microglía y la vía del interferón tipo I in vivo. ....	71
viii. El bloqueo de la vía de señalización del interferón tipo I mediante el anticuerpo neutralizante anti-IFNAR, disminuye la motivación de la descendencia con un comportamiento similar al adictivo in vivo.....	72
ix. La exposición a dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia programan la herencia intergeneracional del comportamiento similar a la adicción a la comida.....	74
x. La exposición a dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia programan la herencia intergeneracional de la sobreexpresión de IL6 en sujetos con un comportamiento similar a la adicción a la comida.....	76
xi. La exposición a dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia programan una inflamación periférica en la descendencia que perdura hasta la tercera generación (F3).....	78
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	81
<b>IX. CONCLUSIÓN</b> .....	89
<b>X. PERSPECTIVAS</b> .....	90
<b>XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b> .....	91
<b>XII. REFERENCIAS</b> .....	93

## AGRADECIMIENTOS

Quiero Agradecer a:

Dr. C. Alberto Camacho Morales por la confianza brindada para la realización de este trabajo, por su apoyo, compromiso e invaluable supervisión en el desarrollo del mismo.

Dra. C. Rocío Ortiz López por su apreciable apoyo, facilitándonos el uso de su equipo de laboratorio, que permitió parte de la realización de este proyecto.

M.C. Marcela Cárdenas Tueme por su apreciable apoyo en la realización de este proyecto.

M.C. Gabriela Cruz Carrillo por su incondicional apoyo en la realización de gran parte de este proyecto.

M.C. Roger Alexis Maldonado Ruiz, por apreciable apoyo en la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante el periodo de realización de este proyecto de investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) por permitirme el uso de sus instalaciones y áreas de trabajo.

A mis amigos y colegas: Luis Ángel Trujillo, Sergio Martínez, Claudia Araujo por su apoyo incondicional a lo largo de estos 4 años de Doctorado.

## DEDICATORIA

Principalmente, mi familia, mi madre **Norma I. Martínez Lara**, mi padre **Manuel Fco. Montalvo Saucedo**, mi hermana **Raquel V. Montalvo Martínez** y mi abuela **María de la Luz Lara Esquivel**, por su apoyo incondicional en la realización de mis metas y sus valiosas palabras de aliento para seguir adelante en momentos difíciles, pero sobre todo por darme la vida y la educación que me ha permitido llegar hasta donde estoy.

Finalmente, a mi esposo **Roger A. Maldonado Ruiz**, por su apoyo incondicional, sus palabras y sobre todo por el inmenso amor que me ha dado y el cual, me ha servido de motivación para ser una mejor persona.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”. -Mahatma Gandhi

Lo único imposible es aquello que no intentas...

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de apoyo: 255317, por el PAICYT 2020 para Alberto Camacho-Morales y la beca de estudiante otorgada por CONACYT a la estudiante Larisa J. Montalvo-Martínez bajo el número de registro: 708452.



## **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 de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, el Departamento de Ciencia Básica de la Escuela de Ciencias de la Salud perteneciente a la Universidad de Monterrey y la Unidad de Neurometabolismo del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL bajo la dirección del Dr. Alberto Camacho Morales.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Circuito neuroquímico de la recompensa.....	18
<b>Figura 2.</b> Programación fetal y herencia epigenética transgeneracional. ....	24
<b>Figura 3.</b> Activación de la producción de citocinas pro-inflamatorias y genes inducibles por interferón tipo I a través del receptor TLR4 en la microglía.....	27
<b>Figura 4.</b> Vías de señalización para la producción de interferones de tipo I y vía de señalización activada por interferones de tipo I .....	29
<b>Figura 5.</b> Modelo de programación fetal nutricional y cohortes experimentales.....	40
<b>Figura 6.</b> Imagen de los componentes de la caja Skinner y esquema gráfico de los protocolos de condicionamiento operante.....	44
<b>Figura 7.</b> Imagen representativa de la región del núcleo accumbens shell para la implantación de cánulas en el hemisferio izquierdo y derecho.....	53
<b>Figura 8.</b> Esquema gráfico del modelo de herencia transgeneracional del comportamiento adictivo.....	57
<b>Figura 9.</b> La programación por dieta de cafetería programa a la descendencia a presentar un comportamiento similar a la adicción.....	60
<b>Figura 10.</b> La programación nutricional materna induce cambios morfológicos en la microglía del núcleo accumbens de descendencia F1.....	62
<b>Figura 11.</b> La programación nutricional materna induce la sobreexpresión de <i>Ifit1</i> y citocinas inflamatorias el núcleo accumbens de la descendencia F1.....	64
<b>Figura 12.</b> La programación nutricional materna induce inflamación periférica en la descendencia F1.....	66
<b>Figura 13.</b> La estimulación con $IFN\alpha$ y PAL inducen la sobreexpresión de <i>Ifit1</i> , $IL6$ e $IL1\beta$ en cultivo de células de microglía.....	68
<b>Figura 14.</b> La estimulación con $IFN\alpha$ y PAL incrementan la capacidad fagocítica de la microglía <i>in vitro</i> .....	70
<b>Figura 15.</b> La estimulación <i>in vivo</i> con $IFN\alpha$ inducen activación de la microglía y la vía del interferón tipo I en el núcleo accumbens shell.....	71

<b>Figura 16.</b> El bloqueo <i>in vivo</i> de la vía del interferón tipo I modula la motivación de sujetos con un comportamiento similar a la adicción.....	73
<b>Figura 17.</b> Herencia transgeneracional del comportamiento adictivo.....	75
<b>Figura 18.</b> La exposición a una dieta hipercalórica durante el embarazo y la lactancia programa la expresión de Ifit1 y citocinas pro-inflamatorias en sujetos con un comportamiento similar al adictivo hasta por 2 generaciones.....	77
<b>Figura 19.</b> La programación nutricional materna programa una inflamación periférica que perdura hasta la segunda generación (F2).....	79
<b>Figura 20.</b> La programación nutricional materna programa una inflamación periférica que perdura hasta la segunda generación (F3).....	80

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Material biológico y no biológico.....	35
<b>Tabla 2.</b> Reactivos.....	36
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos .....	36
<b>Tabla 4.</b> Primers para RTqPCR.....	37
<b>Tabla 5.</b> Equipos de laboratorio.....	37

## ABREVIATURAS

<b>F0</b>	Generación 0 (madres)
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µl</b>	Microlitro
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CAF</b>	Dieta cafetería o grupo cafetería
<b>CD</b>	Dieta control o grupo control
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>Cm<sup>2</sup></b>	Centímetro cuadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DMEM</b>	Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>F1</b>	Primera generación (hijos)
<b>F2</b>	Segunda generación (nietos)
<b>F3</b>	Tercera generación (bisnietos)
<b>FITC</b>	Fluoresceína-5-isotiocianato
<b>FR1</b>	Protocolo fixed ratio 1
<b>FR5</b>	Protocolo fixed ratio 5
<b>Ifit1</b>	Gen inducible por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos 1
<b>IFN tipo I</b>	Interferón de tipo I
<b>IFNAR</b>	Receptor de interferones tipo I (interferones: alfa y beta)
<b>IFNAR1</b>	Receptor de interferones tipo I subunidad 1
<b>IFNs</b>	Interferones
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferón alfa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gama
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IRF9</b>	Factor regulador del interferón 9
<b>MCP-1</b>	Proteína quimio atrayente de monocitos 1
<b>mg</b>	Miligramo
<b>ml</b>	Mililitro
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>PAL</b>	Ácido palmítico
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PR</b>	Protocolo progresivo

<b>RTqPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b><math>\beta</math>-ME</b>	Beta mercaptoetanol

## RESUMEN

La programación nutricional fetal por exposición a alimentos hipercalóricos favorece la herencia transgeneracional de comportamiento similar a la adicción en la descendencia. La exposición a alimentos hipercalóricos también activa la inflamación sistémica y central en la descendencia. El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto de la exposición a alimentos hipercalóricos durante la etapa gestacional en la activación de redes inmunes y la reactividad de la microglía en la región del núcleo accumbens shell (NAc shell) del cerebro de la descendencia y su contribución a la herencia transgeneracional del comportamiento similar a la adicción. Se demostró que la descendencia F1 de ratas Wistar macho expuestas a alimentos hipercalóricos (cafetería, CAF) durante la programación fetal conduce a un comportamiento de adicción empleando la prueba de acondicionamiento operante, comparado con la descendencia F1 expuesta a control (CD). Los análisis de RTqPCR, perfil inmune e inmunotinción de microglía en el NAc shell de sujetos adictos determinaron la sobreexpresión del gen inducible por interferón de tipo I (*Ifit1*) y las citocinas pro-inflamatorias IL6 e IL1 $\beta$  e hiperreactividad de la microglía. Los estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la microglía responde activamente al interferón-alfa (IFN $\alpha$ ) promoviendo una expresión génica de *Ift1*, IL-1 $\beta$  e IL-6 dependiente del tiempo seguida de un aumento de la fagocitosis. Finalmente, se identificó que el fenotipo de comportamiento similar a la adicción se hereda transgeneracionalmente a la descendencia masculina F2 y F3. El aumento de la expresión de *Ifit1* e IL6 se conserva en los sujetos adictos hasta la descendencia F2. Nuestros resultados confirman la señalización de IFN $\alpha$  y la reactividad de la microglía en el NAc shell inducida por la exposición a dieta CAF que favorece la presencia de comportamiento similar a la adicción a la comida en la descendencia de ratas.

## ABSTRACT

Fetal nutritional programming with hypercaloric diet favors offspring's addiction-like behavior transgenerational inheritance. Exposure to hypercaloric diets also activates systemic and central inflammation in offspring. The aim of this study was to characterize the effect of hypercaloric diet exposure during gestational stage on the activation of immune networks and the reactivity of microglia at offspring's NAc shell and its contribution to the transgenerational inheritance of addiction-like behavior. F1 Wistar male offspring exposed to hypercaloric diet (cafeteria, CAF) during gestation displayed an increased addiction-like behavior during operant conditioning test, compared to F1 offspring exposed to control (CD) diet. Analysis of RTqPCR, immune profile and immunostaining determined an overexpression of the type I interferon inducible gene (*Ifit1*) and the proinflammatory cytokines IL6 and IL1 $\beta$ , as well as, a hyper reactive microglia at the NAc shell of addict-subjects. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that microglia actively respond to interferon-alpha (IFN $\alpha$ ) by promoting time-dependent *Ifit1*, IL-1 $\beta$ , and IL-6 gene expression followed by increased phagocytosis. Finally, it was identified that the addiction-like behavior phenotype is inherited transgenerationally to F2 and F3 male offspring. Increased expression of *Ifit1* and IL6 is preserved in addicted subjects up to F2 offspring. Our results confirm IFN $\alpha$  signaling and microglial reactivity in the NAc shell induced by CAF diet exposure that favors the presence of food addiction-like behavior in the offspring of rats.



## I. INTRODUCCIÓN

El consumo frecuente y excesivo de alimentos hipercalóricos o de alto contenido en grasas y/o azúcares, es uno de los factores más importantes que contribuyen al desarrollo de obesidad y sus comorbilidades y que impactan negativamente la salud de los individuos. Evidencia experimental confirma que el alto contenido energético de dichos alimentos genera un desequilibrio calórico, en donde el número de calorías consumidas excede la cantidad de calorías gastadas favoreciendo la acumulación excesiva de grasa corporal (Ludwig 2001). La incapacidad de los sujetos con obesidad para controlar la ingesta excesiva de comida hipercalórica, sugiere la existencia de un comportamiento adictivo, similar al observado en el abuso de drogas (Kenny 2011b; N D Volkow et al. 2012; Hauck, Cook, and Ellrott 2020). En ambos casos, tanto la conducta compulsiva hacia la búsqueda e ingesta de comida hipercalórica y la de drogas, derivan de alteraciones en la expresión de genes selectivos en regiones del circuito de la recompensa. Este circuito se compone principalmente de regiones cerebrales que incluyen el área ventral tegmental (AVT), la amígdala, la corteza prefrontal (CPF) y el NAc (Koob and Volkow 2010, 2016; Lindgren et al. 2018).

Desde el punto de vista celular, el establecimiento de la adicción se asocia a un proceso de plasticidad neuronal en regiones del circuito de la recompensa, que implica cambios en la expresión de genes inducidos por el uso crónico del estímulo recompensante, generalmente las drogas (Maze and Nestler 2011; Ersche et al. 2012). Diversas investigaciones han demostrado que la región del NAc es una región clave implicada en los procesos motivacionales-adictivos hacia la comida apetecible e hipercalórica que conducen a la obesidad (N D Volkow et al. 2012; Nora D. Volkow, Wang, and Baler 2011; Kenny 2011a). En este contexto, la exposición a comida hipercalórica genera alteraciones en la

expresión de genes en el NAc, asociados a la regulación de procesos sinápticos como: la tirosina hidroxilasa, los receptores de dopamina D1 y D2, el receptor  $\mu$ -opioide, el receptor CB1 y el factor de transcripción BDNF, así como genes relacionados a procesos de inflamación como las citocinas pro-inflamatorias: IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL6 e Ifit1, lo cual se refleja en alteraciones del comportamiento hacia la ingesta de comida hipercalórica (Zhi Yi Ong et al. 2013; Martire et al. 2014; Gutiérrez-Martos et al. 2017; Cruz-carrillo et al. 2020). Dichos cambios en la expresión génica, también se han identificado en la descendencia de modelos animales de obesidad o con exposición a dietas hipercalórica durante el embarazo y la lactancia, lo cual se propone afecta el desarrollo del sistema nervioso del feto y lo conduce a presentar alteraciones del comportamiento, incluyendo el desarrollo de adicción (Z Y Ong and Muhlhausler 2011; Naef et al. 2011; Gutiérrez-Martos et al. 2017; Sarker et al. 2019; Peleg-Raibstein et al. 2016; Cruz-carrillo et al. 2020).

Diversos autores han reportado que tanto los factores nutricionales, los inflamatorios y de comportamiento que experimentan los padres, pueden tener efectos adversos en la conducta de su descendencia (Szyf 2015; Bohacek and Mansuy 2015; Bale et al. 2010; Bale 2015b). Se ha demostrado que durante la exposición a dietas hipercalóricas y la aparición de un estado pro-inflamatorio, así como una conducta adictiva durante el embarazo, pueden afectar el desarrollo embrionario fisiológico y programar negativamente a la descendencia para presentar un fenotipo adictivo (Peleg-Raibstein et al. 2016; Sarker et al. 2019; Cruz-carrillo et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2019). A este proceso fisiológico aberrante se le ha denominado programación fetal de la descendencia (Hales and Barker 2001; Barker 1998). Durante este proceso, la programación de un fenotipo involucra cambios epigenéticos, que dependiendo del momento durante el desarrollo en el cual ocurren, pueden conducir a la herencia transgeneracional del fenotipo aberrante, inclusive en ausencia del

estímulo inicial (Bohacek and Mansuy 2015; Bale et al. 2010). Algunos autores, han reportado que la programación fetal por la exposición a dietas hipercalóricas favorece la herencia transgeneracional de fenotipos conductuales aberrantes que incluyen a la depresión, ansiedad y déficit de memoria y aprendizaje (Peleg-Raibstein et al. 2016; Sarker and Peleg-Raibstein 2019; Edlow 2017). Sin embargo, a la fecha sólo existe un único reporte experimental que demuestra la presencia de herencia transgeneracional del fenotipo adictivo inducido por programación fetal con dietas hipercalóricas (Sarker et al. 2018), sin embargo, este trabajo carece de marcadores moleculares y genómicos selectivos que pudieran explicar la modulación de la función del cerebro para consolidar la adicción. Asimismo, no hay evidencia sobre el efecto de la programación fetal por dietas hipercalóricas en la inducción de inflamación en regiones del sistema de la recompensa y su contribución en el desarrollo y herencia del fenotipo adictivo.

Con base en los antecedentes, en este proyecto se propuso evaluar el efecto de la programación fetal por exposición a dietas hipercalóricas en la inducción de inflamación central por la activación de la vía del interferón tipo I, y su papel en el desarrollo y herencia transgeneracional del comportamiento adictivo.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Adicción**

La adicción se define como una enfermedad crónica y recurrente del cerebro que se caracteriza por la búsqueda y el consumo compulsivo de un estímulo recompensante, a pesar de sus consecuencias nocivas. Dicha enfermedad es consecuencia de cambios morfológicos (neuroplasticidad) a nivel cerebral, específicamente en regiones que pertenecen al circuito de la recompensa, lo cual promueve el incremento de un comportamiento compulsivo y pérdida de control sobre el consumo del estímulo recompensante (Koob and Volkow 2010, 2016).

De interés, diversos autores han demostrado que tanto las drogas como los alimentos apetecibles (ricos en azúcar y grasas), son capaces de activar regiones del sistema de la recompensa como la región del NAc que involucra circuitos dopaminérgicos, los cuales, a su vez se ha demostrado sufren cambios en la expresión génica y aumenta la motivación hacia la búsqueda y consumo de ambos estimulantes (Nora D. Volkow, Wang, and Baler 2011; N D Volkow et al. 2012).

### **2.2 La adicción a la comida: un problema de comportamiento aberrante y desregulación central de la ingesta de alimentos**

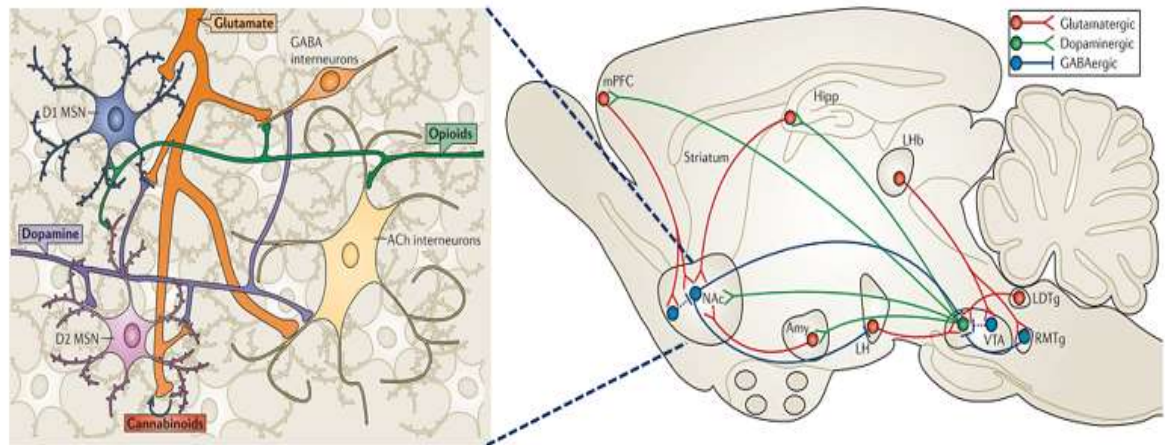
De manera natural, todos los seres vivos requieren de la síntesis de energía para vivir y llevar a cabo sus funciones fisiológicas. La energía que mantiene la función fisiológica del cuerpo proviene de los nutrientes ingeridos. En este contexto, el sistema nervioso central (SNC), es el encargado de regular cuándo y cuánto alimento se tiene que ingerir (Berthoud

2004, 2007). Se sabe que el SNC integra tres sistemas cerebrales: principalmente el tallo cerebral y el hipotálamo, los cuales controlan la saciedad y hambre por medio de la integración funcional de hormonas periféricas tales como la leptina, la insulina y la ghrelina, así como de nutrientes (ej. glucosa, lípidos y aminoácidos), en conjunto con diversos estímulos y señales de origen central en células propias del cerebro (ej. señalización mediada por neurotransmisores) (Jr and Olson 2014). El tercer sistema cerebral involucrado en el control de la ingesta de alimento es el sistema de la recompensa, el cual se describe a continuación.

El circuito de la recompensa está compuesto por núcleos o grupos de células en el SNC que obedecen a estímulos externos de naturaleza sintética o natural, regulados por neurotransmisores y que permiten que el individuo desarrolle conductas aprendidas que responden a hechos placenteros o de desagrado. Las regiones cerebrales que lo conforma son principalmente las que integran las vías de neurotransmisión dopaminérgica que incluyen: el AVT, la amígdala, la CPF y el NAc (Figura 1). También existen otras regiones cerebrales implicadas en el desarrollo de las adicciones e importantes para el circuito de la recompensa. Por ejemplo, el hipocampo (Hipp), el tálamo (Thal), el locus coeruleus (LC), la corteza orbitofrontal (OFC), el rafe dorsal serotoninérgico (DR), el hipotálamo lateral (LH), el estriado, la sustancia nigra pars compacta (SNr), entre otras (Koob and Volkow 2010; Russo and Nestler 2013) (Figura 1). En conjunto, en condiciones normales estas regiones regulan la ingesta de comida modulando la motivación y ejecución de búsqueda de alimentos en los individuos. Sin embargo, alteraciones en estas regiones pueden desencadenar una serie de comportamientos aberrantes que incluyen la predicción de la recompensa (Schultz 2007), la hedonia (Berridge and Robinson 1998), el reforzamiento, la motivación, el aprendizaje

(Koob and Volkow 2016; Nora D Volkow et al. 2009) y la prominencia de incentivos (Berridge 2007), aspectos característicos de un comportamiento adictivo.

Como se mencionó anteriormente, el SNC juega un papel importante en la regulación del comportamiento de motivación para la obtención de alimentos, la cantidad de los mismos que son necesarios para la homeostasis y el funcionamiento eficiente de un organismo. Sin embargo, diversos investigadores proponen que la comida hipercalórica (rica en grasa o en azúcar) debido a su alto valor recompensante (hedónico), favorece la existencia de un comportamiento motivante a su consumo. En este contexto, se incrementa la búsqueda y obtención de comida hipercalórica, lo cual puede generar la evasión fisiológica del sistema de regulación de energía corporal. Diversas evidencias en modelos animales y en humanos, han demostrado que la exposición repetida a comida con alto contenido de grasa y/o azúcar, deterioran la inhibición de la ingesta de comida a nivel neuronal, promoviendo incapacidad de los individuos para controlar la ingesta de alimentos hipercalóricos. Estas alteraciones conductuales correlacionan cercanamente con el desarrollo de adicción a drogas, las cuales incluyen: 1) pérdida del control del estímulo (droga o comida), 2) perseverancia del consumo a pesar de las consecuencias negativas que implica su ingesta, y 3) incremento en el tiempo invertido en el consumo y la búsqueda del estímulo con respecto a otras actividades (Nora D Volkow, Wise, and Baler 2017; Nora D. Volkow, Wang, and Baler 2011; Koob and Volkow 2016; Lindgren et al. 2018).



**Organización celular del núcleo accumbens**

**Figura 1. Circuito neuroquímico de la recompensa.** Imagen representativa de las principales regiones del circuito de la recompensa y señalizaciones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas. El circuito de recompensa principal incluye proyecciones dopaminérgicas que van desde el VTA hacia el NAc, que liberan dopamina en respuesta a estímulos relacionados con la recompensa (y en algunos casos, estímulos relacionados con la aversión). El NAc también contiene numerosos tipos de interneuronas, por tanto, recibe generalmente inervaciones de circuitos glutamatérgicos de la corteza prefrontal medial (mPFC), hipocampo y amígdala, así como de otras regiones. El VTA también recibe estas señales desde el tegmento dorsal lateral (LDTg), la hipófisis lateral (LHb) y el hipotálamo lateral. Todas estas diversas entradas glutamatérgicas entre regiones controlan aspectos de la percepción y la memoria relacionadas con la recompensa. \*Modificada de: Robison A.J. and Nestler E.J., 2011; Russo S.J. and Nestler E.J., 2013.

Por su parte, estudios iniciales efectuados en el año de 1998, demostraron que estímulos externos como la ingesta de un tipo selectivo de dieta, infecciones y estrés durante el embarazo de una madre puede tener efectos negativos en el metabolismo y conducta de su descendencia (Bale et al. 2010; Barker 1998). Nuestro grupo de investigación y otros autores alrededor del mundo hemos demostrado que la exposición a dietas de alta energía durante el embarazo conducen a comportamientos aberrantes en la descendencia, que incluyen a la depresión (de la Garza et al. 2019; Trujillo-Villarreal et al. 2021), ansiedad (Glendining, Fisher, and Jasoni 2018) y comportamientos similares a la adicción (Camacho et al. 2017; Sarker et al. 2019; Peleg-Raibstein et al. 2016; Cruz-carrillo et al. 2020). Se propone que este tipo de exposición programa a nivel fetal el comportamiento de motivación hacia recompensas no naturales en su descendencia que ocurren posterior al nacimiento y

que incluyen el consumo de alcohol, comida y drogas (Teegarden, Scott, and Bale 2009; Naef et al. 2011; Peleg-Raibstein et al. 2016; Camacho et al. 2017; Cruz-carrillo et al. 2020).

### **2.3 Programación fetal**

Los cambios ambientales o estímulos adversos que perturban la homeostasis de un organismo en desarrollo -incluyendo el estrés, los retos nutricionales, las infecciones, aspectos conductuales, hormonales, etc.- influyen en el desarrollo embrionario del sujeto. La integración de estos estímulos puede tener un efecto positivo o negativo en la fisiología del individuo regulando procesos de expresión génica selectiva en un fenómeno fisiológico conocido como programación (Figura 2A). Notablemente, dicha programación puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo (Bale 2015a; Szyf 2015), en donde la etapa de gestacional-fetal es la más relevante para generar cambios perdurables que pueden ocasionar daños fisiológicos con manifestaciones conductuales específicas posterior al nacimiento de los descendientes (Figura 2B). A este periodo de regulación fisiológica se le conoce como programación fetal de la descendencia, la cual puede inclusive perdurar y ser transmitida a generaciones posteriores sin la presencia del desencadenante causal inicial; definiendo así el término conocido como herencia epigenética transgeneracional (C. Guerrero-Bosagna and Skinner 2012; Bohacek and Mansuy 2015; Bale 2015b).

#### **2.3.1 Mecanismos de regulación y herencia epigenética del fenotipo adictivo**

Las características fenotípicas de un individuo se heredan por la transferencia de modificaciones en la secuencia de DNA a través de la línea germinal. Sin embargo, investigaciones recientes han evidenciado que los rasgos conductuales o de sensibilidad a enfermedades pueden ser transmitidos a la descendencia a través de un mecanismo



epigenético (C. Guerrero-Bosagna and Skinner 2012; C. and S. K. Guerrero-Bosagna 2013; Szyf 2015).

La epigenética, puede ser definida como una serie de procesos bioquímicos a través de los cuales se ejercen cambios en la expresión génica durante todo el ciclo de vida de un organismo, sin cambiar la secuencia del DNA (Jaenisch and Bird 2003; Szyf 2015). La acetilación de histonas, es la modificación de la cromatina más estudiada en los modelos de adicción a drogas. Múltiples tipos de drogas, inducen cambios en la acetilación de las histonas, promoviendo así la descondensación de la cromatina y permitiendo la activación transcripcional de los genes (Maze and Nestler 2011). Por ejemplo, en el NAc se ha observado que después de una exposición aguda o crónica a cocaína y otros estimulantes (Kumar et al. 2005), existe un incremento en la acetilación global de las histonas H3 y H4. Este evento podría explicar la sobreexpresión de diversos genes involucrados en la patología del proceso adictivo. Además, el incremento de c-Fos, consecuencia de la acetilación de la H4, y el incremento del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la ciclina dependiente de quinasa 5 (Cdk5) y la CaMKII $\alpha$ , a consecuencia de la acetilación de la H3 (Kumar et al. 2005; Renthal and Nestler 2009; Gajewski, Turecki, and Robison 2016). Por otra parte, la metilación del DNA se asocia a la represión de la transcripción de los genes en el DNA, mediante el reclutamiento de complejos co-represores (por ejemplo, HDACs y HMT) que pueden obstaculizar estéricamente la maquinaria transcripcional o modificar la estructura de los nucleosomas (Nestler 2014). Al igual que la acetilación de histonas, dicho mecanismos se ha visto involucrado en la alteración de la expresión de genes específicos involucrados en las modificaciones estructurales patológicas de las adicciones. Así, la proteína de unión a islas CpG metiladas 2 (MeCP2), una proteína que se une a DNA metilado y contribuye a la represión de la expresión génica, se sugiere reprime la transcripción

específica de algunos microRNAs, dando como resultado la represión del factor BDNF (Im et al. 2010). Además, MeCP2 se involucra en modificaciones neuronales y el aumento o la disminución del consumo de drogas, dependiente de su sobreexpresión o subexpresión, respectivamente, en el NAc (Im et al. 2010; Deng et al. 2010).

En su conjunto, las modificaciones moleculares asociadas al desarrollo del comportamiento aberrante en las adicciones representan eventos clave en la transmisión del fenotipo adictivo de padres a hijos (Figura 2C) (Bale 2015a; Bohacek and Mansuy 2015; Sarker and Peleg-Raibstein 2019), e incluso a generaciones posteriores como se describe a continuación.

### **2.3.2 Herencia transgeneracional del fenotipo adictivo**

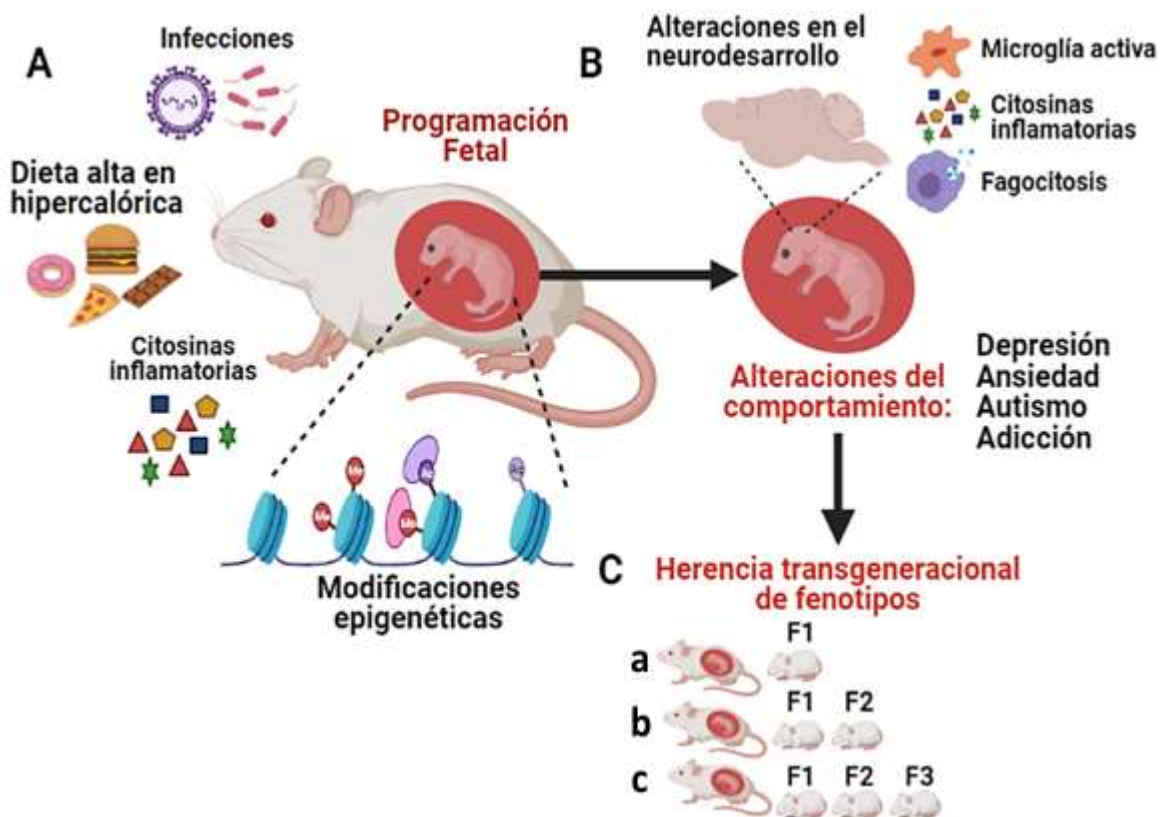
Como se mencionó anteriormente, la herencia transgeneracional epigenética puede proporcionar un mecanismo molecular por el cual el fenotipo adictivo de los padres puede transmitirse a las siguientes generaciones de sus descendientes. La herencia transgeneracional epigenética se define como “la herencia de información epigenética mediada por la línea germinal entre generaciones en ausencia de influencias ambientales directas que conduzcan a la variación fenotípica”. Por el contrario, la herencia "multigeneracional" es derivada de la exposición directa a un estímulo. Por lo tanto, si la exposición al estímulo ocurre en machos o hembras F0 antes del embarazo, las células germinales, que continúan produciendo la generación F1, también están "expuestas". Por lo tanto, los fenotipos que se encuentran en los animales F0 y F1 son multigeneracionales y solo los presentes en los animales F2 se consideran transgeneracionales, ya que estos animales F2 son la primera generación cuyas células no han sido expuestas al fármaco. En este sentido, evidencias recientes sugieren que la exposición de los padres (machos y hembras) tanto a drogas como a alimentos

hipercalóricos producen cambios conductuales, bioquímicos y neuroanatómicos que pueden ser transmitidos hasta una tercera generación (F3) confirmando así el potencial de herencia transgeneracional del fenotipo adictivo (Peleg-Raibstein et al. 2016; Sarker and Peleg-Raibstein 2019; Sarker et al. 2018).

#### **2.4 Efecto de la programación fetal por exposición a nutrientes hipercalóricos en el desarrollo y herencia del comportamiento adictivo en la descendencia**

Al igual que la programación del comportamiento adictivo hacia drogas de abuso, se ha determinado que la exposición de madres a una dieta alta en grasa durante la gestación, es capaz de generar cambios en la regulación de los sistemas dopaminérgicos en el NAc, induciendo alteraciones en el comportamiento de la descendencia. Por ejemplo, el consumo de una dieta alta en grasa durante el desarrollo fetal, promueve el incremento del comportamiento motivante hacia recompensas hipercalóricas en la descendencia, lo cual correlaciona con alteraciones en la regulación pre sináptica de dopamina en el NAc (Naef et al. 2011; Zhi Yi Ong et al. 2013; Z Y Ong and Muhlhausler 2011). También, Gugusheff y colaboradores en 2016, demostraron que el consumo de una dieta hipercalórica durante diferentes periodos del desarrollo (durante la gestación o la lactancia), generan en la descendencia una preferencia por dietas apetecibles (hipercalóricas), lo cual podría ser consecuencia de alteraciones en el sistema de señalización de opioides en regiones del sistema de la recompensa como el NAc y el AVT (J.R. et al. 2016). Además, la programación metabólica por nutrientes hipercalóricos y/o la presencia de un estado metabólico positivo de las madres empleando modelos animales y en humanos, han demostrado alteraciones en el ambiente intrauterino y la generación de cambios en el comportamiento de su descendencia, entre los que destacan la presencia de ansiedad (Warneke et al. 2014),

depresión (de la Garza et al. 2019; Trujillo-Villarreal et al. 2021), déficit de atención, desorden de hiperactividad, trastornos del espectro autista (Figura 2B) (Sullivan, Nousen, and Chamlou 2014; Warneke et al. 2014; Rijlaarsdam et al. 2016) y adicción (Cruz-carrillo et al. 2020; Camacho et al. 2017; Peleg-Raibstein et al. 2016). De interés, la mayoría de las investigaciones coinciden en que dichas alteraciones en el comportamiento por exposición a dietas hipercalóricas son debidas a eventos de regulación epigenética similares a los descritos en la programación del comportamiento adictivo (Donkin et al. 2016; Wu et al. 2016; Holland et al. 2016; Cruz-carrillo et al. 2020). Adicionalmente, reportes previos de nuestro grupo de investigación y datos experimentales no publicados, han demostrado que la programación fetal con dietas hipercalóricas inducen la sobreexpresión de genes relacionados a la vía del interferón tipo I y citocinas inflamatorias, así como la activación de las células de microglía en el hipocampo, lo cual se asoció al desarrollo de un comportamiento similar a la adicción y a la ingesta descontrolada de alimento hipercalórico (Cruz-carrillo et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2019). En este contexto, la implicación de la neuroinflamación o activación de la respuesta inmune en el SNC podría modular la patogénesis de la adicción a la comida en modelos de roedores.



**Figura 2. Programación fetal y herencia epigenética transgeneracional.** **A.** Factores externos como la dieta materna, las infecciones, las citosinas y el estrés conductual, pueden alterar el ambiente intrauterino promoviendo una programación fetal, mediada por cambios epigenéticos en histonas o el DNA, como metilaciones y acetilaciones, que pueden ocurrir en diversos niveles celulares (células somáticas y germinales del embrión), lo cual puede tener repercusión en el estado de salud de la descendencia durante el desarrollo o en etapas posteriores de la vida; incluso pueden promover la herencia del fenotipo adquirido. **B.** Alteraciones del neurodesarrollo: cambios en la expresión génica pueden conducir a la activación de la microglía, mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias y mayor actividad fagocítica de material sináptico, lo cual puede promover neurodegeneración, desencadenando el desarrollo de diversos trastornos conductuales en la descendencia como: depresión, ansiedad, autismo y adicción. **C.** Modelos de herencia transgeneracional, según el nivel de programación o exposición al estímulo causal: a) Programación en células somáticas terminales, perpetuación del fenotipo solo hasta generación F1. b) Programación en células somáticas y células germinales primordiales, transmisión del fenotipo hasta generación F2. c) Programación estable de células germinales, herencia perpetua hasta generaciones F3.

## 2.5 Definición y función de la respuesta Inflamatoria

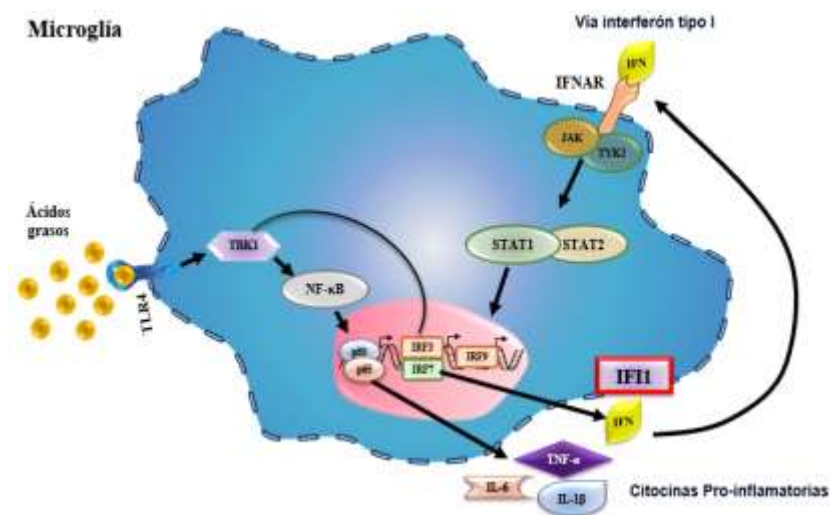
La respuesta inflamatoria es producto de la integración de los sistemas celular innato y respuestas humorales que ocurren al presentarse algún tipo de lesión tisular por traumatismo, isquemia, etc. o bien debido a infecciones por patógenos en los organismos. Para la activación de la respuesta inflamatoria se requiere del reclutamiento de macrófagos

y leucocitos, así como la activación de células endoteliales, agregación plaquetaria y liberación de diversas citocinas incluyendo la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que en su conjunto mantienen la homeostasis corporal del organismo (Ciaccia 2010). Según la duración y el tipo de células que participan en la respuesta inflamatoria, esta puede dividirse en dos tipos: 1) Inflamación aguda, caracterizada por una abundante presencia de neutrófilos, que montan una respuesta inmune corta de tan solo minutos hasta algunas horas, o 2) Inflamatoria crónica, la cual puede durar días o hasta años con una población predominante de linfocitos en el tejido inflamado. Esta última es el tipo de inflamación que se ha asociado con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer, depresión, ansiedad, autismo y adicción (Edlow 2017; Montalvo-Martínez et al. 2018).

### **2.5.1 Inflamación metabólica y su relación con trastornos cognitivos**

El consumo excesivo de dietas hipercalóricas generan un perfil inflamatorio periférico que puede conducir a inflamación central y podría modular el comportamiento de la descendencia. Esta respuesta inflamatoria puede originarse por el reclutamiento y migración de células periféricas del sistema inmune, principalmente macrófagos y células B hacia el SNC promoviendo la generación de inflamación (Buckman et al. 2014). Sin embargo, las evidencias más recientes, han demostrado la participación de las células inmunes residentes del SNC en la activación y respuesta a estímulos inflamatorios inducidos por dietas hipercalóricas (Lépinay et al. 2015; Gutiérrez-Martos et al. 2017). La microglía son células del sistema inmune innato residentes del SNC, cuya activación se ha documentado en el desarrollo de inflamación en diversos desórdenes neuronales (Salter and Stevens 2017; Walker and Lue 2015). Fisiológicamente, la microglía tiene funciones

versátiles, incluyendo su interacción con las sinapsis para modular la plasticidad sináptica y su actividad fagocítica durante la neurogénesis y apoptosis (Schafer and Stevens 2015; Wake, Moorhouse, and Nabekura 2011), sin embargo, bajo circunstancias patológicas dichos procesos pueden desencadenar alteraciones metabólicas y conductuales. Se ha reportado que la ingesta crónica de dieta alta en grasa, disminuye la formación de memoria espacial dependiente del hipocampo, debido a la activación de un proceso denominado “poda” sináptica mediado por la microglía (Hao et al. 2016). Adicionalmente, en estudios recientes se demostró que la ingesta de dieta alta en grasas saturadas incrementa la expresión de citocinas inflamatorias en el hipotálamo sin evidencia de signos de inflamación periférica, presumiblemente regulada por la microglía (Figura 3) (Valdearcos et al. 2014, 2017; Milanski et al. 2009). En el contexto del comportamiento adictivo, se ha reportado que la exposición prolongada a una dieta alta en calorías, conduce al desarrollo de una conducta similar a la adictiva hacia el consumo en exceso de alimentos hipercalóricos y consecuente desarrollo de sobrepeso en ratones. Además, los ratones presentan modificaciones de plasticidad estructural en neuronas espinosas medianas, y a un aumento de la expresión de factores neuroinflamatorios y activación de la microglía en el NAc (Gutiérrez-Martos et al. 2017); que como comentamos previamente es una área clave del sistema de recompensa involucrado en el comportamiento adictivo (Koob and Volkow 2010).



**Figura 3. Activación de la producción de citocinas pro-inflamatorias y genes inducibles por interferón tipo I a través del receptor TLR4 en la microglía.** Representación esquemática del mecanismo propuesto por el cual los ácidos grasos saturados a través del receptor TLR4 inducen la activación de la vía NF-κB, promoviendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias e interferones de tipo I, los cuales a su vez activan a su receptor IFNAR desencadenando la vía de señalización canónica del interferón tipo I, que conduce a la expresión de genes inducibles por interferón (ISGs) que incluyen al gen Ifit1.

## 2.6 Papel de la activación de la respuesta a interferón tipo I en el desarrollo de conductas adictivas

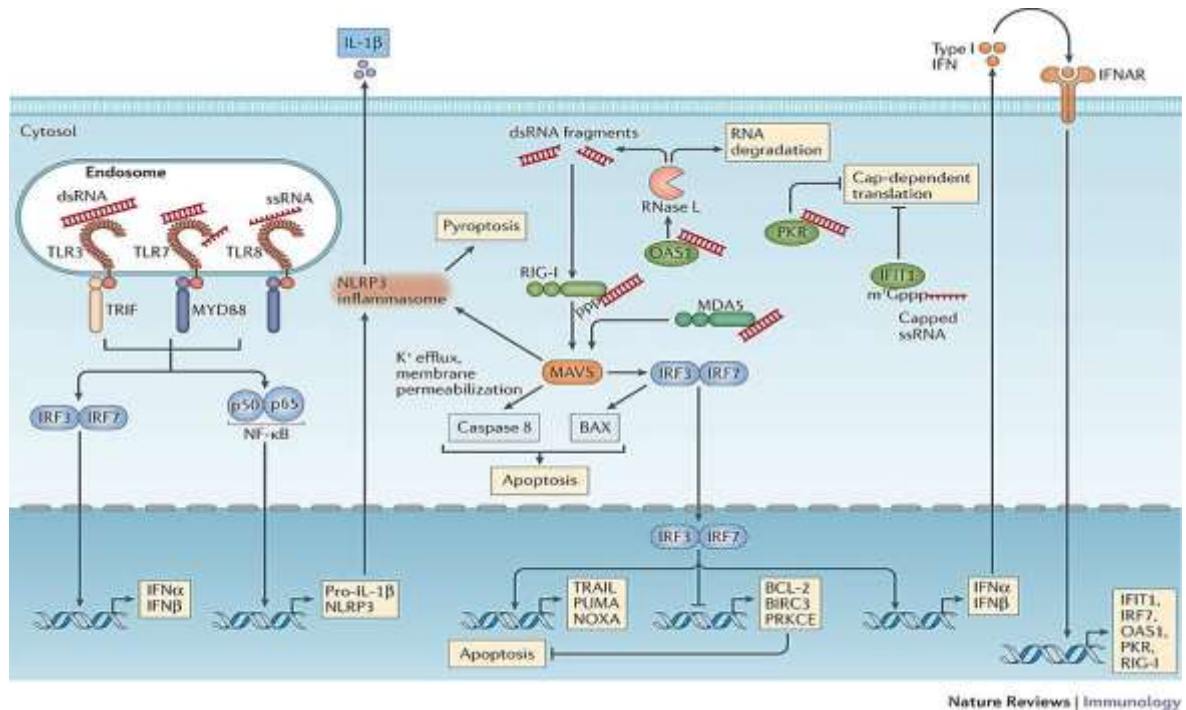
Diversos autores sugieren que las dietas con alto contenido de ácidos grasos activan el receptor tipo Toll 4 (TLR4) en adipocitos, macrófagos, neuronas y microglía y promueven la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL6, IL1β y TNFα, así como genes clásicos inducibles por interferón (ISG) como IFI6, GBP-1, Mx-1 e IFITM1 (Figura 3) (Milanski et al. 2009; Wang et al. 2012; Diamond and Farzan 2013; Valdearcos et al. 2017, 2014; Tse et al. 2015), lo cual puede conducir al desarrollo de trastornos del comportamiento incluida la adicción a la comida (Cruz-carrillo et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2019; Montalvo-Martínez et al. 2018). La activación central de la señalización de TLR4 en la microglía también favorece la producción de TNF-α, la cual puede modular la conducta adictiva inducida por drogas (Schwarz, Smith, and Bilbo 2013; Lewitus et al. 2016). Por el contrario, se determinó que el uso de tratamientos antiinflamatorios de tipo farmacológico o



el bloqueo de la vía TLR4, revierte el comportamiento de adicción a la metanfetamina (Snider, Hendrick, and Beardsley 2013; Attarzadeh-Yazdi, Arezoomandan, and Haghparast 2014) y reduce la búsqueda de drogas como la cocaína y la morfina (Tanda et al. 2016; Chen et al. 2017; Brown et al. 2018). Por su parte, el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$  son capaces de unirse a las subunidades del receptor de interferón alfa / beta (IFNAR1 e IFNAR2) lo que favorece la supervivencia neuronal, la plasticidad neuronal y el crecimiento de neuritas (Ejlerskov et al. 2015; Blank and Prinz 2017; Hosseini et al. 2020), y también se ha demostrado que activan la respuesta de la microglía a las infecciones por patógenos que conduce a la producción de los ISG (Nallar and Kalvakolanu 2014; Blank and Prinz 2017).

Los interferones son proteínas o glicoproteínas producidas por distintos tipos celulares como respuesta a estímulos diversos entre los que destacan las infecciones virales. Se distinguen tres clases de interferones según sus características estructurales y biológicas: 1) interferón  $\alpha$  o tipo leucocitario, 2) interferón  $\beta$  o tipo fibroblástico e 3) interferón  $\gamma$  o tipo inmune, producido por linfocitos T y células asesinas naturales (NK). Los dos primeros ( $\alpha/\beta$ ) son denominados interferones de tipo I, mientras que el interferón  $\gamma$ , corresponde al tipo II, que en su conjunto integran la respuesta inmune contra infecciones virales agudas. Sin embargo, también se ha demostrado que los ácidos nucleicos microbianos, los polisacáridos y los lípidos saturados, son capaces de inducir la producción de interferones a través de la activación de los receptores tipo Toll (TLRs) (Milanski et al. 2009; Wang et al. 2012). Por su parte, los interferones, se unen a receptores de membrana específicos para interferón denominados IFNAR. Después de unirse a sus receptores de alta afinidad, los IFNs inician una cascada de señalización a través de proteínas de señalización que también pueden ser activadas por otras citocinas, conduciendo a la producción de los genes ISG específicos, que

poseen los efectos antivirales, así como también inmunoreguladores y antitumorales (Figura 4).



**Figura 4. Vías de señalización para la producción de interferones de tipo I y vía de señalización activada por interferones de tipo I.** Los principales inductores de la producción de interferón de tipo I (INF- $\alpha$  / INF- $\beta$ ) son ácidos nucleicos, por ejemplo, DNA o RNA, ya sea de doble o cadena sencilla, así como otros estímulos incluyendo a los lípidos, los cuales son reconocidos por distintos tipos de receptores tipo Toll, presentes en los endosomas (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) o en la membrana plasmática de la célula (TLR4); desencadenando una cascada de señalización que involucra la fosforilación de factores reguladores de IFN (IRFs), los cuales una vez fosforilados son translocados al núcleo para inducir la transcripción de IFN- $\alpha$  y/o IFN- $\beta$ . Otra vía de señalización involucrada es aquella mediada por proteínas citoplasmáticas como RIG-I/MDA5, las cuales reconocen el material genético viral en el citoplasma celular y activan a los factores IRF3/7 con el fin de inducir la producción de interferones o bien la apoptosis de la célula. Los interferones IFN- $\alpha$  / IFN- $\beta$ , son posteriormente reconocidos por receptores de membrana (IFNAR), los cuales activan la vía de señalización mediada por las proteínas JAK/STAT, las cuales se unen al factor IRF9 para ser translocado al núcleo e inducir la expresión de diversos genes incluyendo a aquellos de la familia IFIT. \*Imagen tomada y modificada de Schlee & Hartmann, 2016

Entre los primeros genes inducibles por interferón descubierto hace casi 3 décadas, se encuentra el gen 56 estimulado por IFN (ISG56) cuyo símbolo genético oficial es IFIT1. Este forma parte de una familia de 4 genes conformada por los genes, ISG56 / IFIT, ISG54

/ IFIT2, ISG60 / IFIT3 e ISG58 / IFIT5 en humanos o 3 genes ISG56 / Ifit1, ISG54 / Ifit2 y ISG49 / Ifit3 en ratones y ratas (Fensterl and Sen 2011). De todos estos, el gen Ifit1 se ha encontrado alterado en modelos de programación fetal por exposición a drogas como el éxtasis (MDMA) (Eun et al. 2010), así como sobre-expresado en células neuronales expuestas a cocaína a las 24 horas (Crawford et al. 2006). Investigaciones recientes han demostrado que la programación inmune materna induce la programación de las células de la microglía de la descendencia a sobre expresar genes inducibles por interferón tipo I entre los que destaca el Ifit1 (Ben-Yehuda et al. 2020). La activación de la señalización del interferón tipo I favorece en el SNC parece promover desenlaces negativos en la fisiología cerebral. Por ejemplo se ha implicado en el desarrollo de microglías reactivas y en el incremento en la fagocitosis de material sináptico que contribuye al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (Bialas et al. 2017), así como enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Roy et al. 2020; Taylor et al. 2014, 2018), la depresión (Mostafavi et al. 2014) y deterioro cognitivo (West et al. 2019), las cuales a su vez se han asociado a la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Ransohoff 2016; Lyman et al. 2014). Por otro lado, la inhibición de la vía de señalización del interferón tipo I, confirma que el bloqueo puede disminuir la activación de la microglía y reducir la pérdida de sinapsis (Roy et al. 2020) y la muerte neuronal (Baruch et al. 2014; Taylor et al. 2014).

Basado en estos estudios proponemos que la activación de la respuesta a interferón de tipo I y citocinas pro-inflamatorias pueden modular procesos moleculares que subyacen a la adicción y su potencial hereditario. Esta propuesta también se fundamenta con reportes previos de nuestro grupo de investigación, en donde identificamos la sobre-expresión del gen Ifit1 y las citocinas IL6 e IL1 $\beta$  en el NAc de animales que mostraron un comportamiento similar al adictivo hacia recompensas hipercalóricas (Cruz-carrillo et al. 2020), así como la

activación de la microglía en el hipocampo de la descendencia de un modelo de programación fetal por nutrientes, lo cual se asoció a una mayor ingesta de alimentos hipercalóricos (Maldonado-Ruiz et al. 2019).

De resultar cierta nuestra hipótesis, esta investigación contribuiría a esclarecer el papel de la neuroinflamación cerebral como un mecanismo molecular que subyace al comportamiento adictivo a la comida apetecible.

### III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad o sobrenutrición durante el embarazo programa a la descendencia a presentar alteraciones en el comportamiento motivante semejantes a la adicción. Evidencia científica empleando modelos animales ha demostrado que la programación nutricional induce la activación de inflamación sistémica y central. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la descendencia de madres expuestas a dieta hipercalórica durante el embarazo, presentan una sobreexpresión del gen *Ifit1* en la región del NAc shell, lo cual se asocia a una mayor motivación hacia el consumo de recompensas apetecibles. Sin embargo, se desconoce el papel que juega la activación de la vía del interferón de tipo I en la región del NAc de la descendencia y su contribución en el desarrollo y herencia transgeneracional del fenotipo adictivo.

En este trabajo se propuso evaluar la contribución de la programación fetal por nutrientes hipercalóricos en la herencia transgeneracional de la vía del interferón tipo I para modular la neuroinflamación del sistema nervioso y la susceptibilidad al desarrollo de adicción a la comida en un modelo murino.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La programación nutricional materna programa la vía de señalización del interferón tipo I en la región del NAc shell y contribuye a la reactividad de la microglía y la herencia transgeneracional de la conducta similar a la adicción en ratas.

## V. OBJETIVOS

### i. Objetivo General

Caracterizar el efecto de la programación nutricional materna en la vía de señalización del interferón tipo I en la región del NAc shell y evaluar su posible contribución a la reactividad de la microglía y la herencia transgeneracional de la conducta similar a la adicción en un modelo murino.

### ii. Objetivos Específicos

- 1) Determinar el efecto de la programación por dieta de cafetería en la activación de la microglía y la expresión del gen *Ifit1* y citocinas pro-inflamatorias (IL6 e IL1 $\beta$ ) en el NAc de la descendencia F1 en un modelo murino.
- 2) Evaluar el estado de inflamación periférica de la descendencia F1 de madres expuestas a dieta de cafetería.
- 3) Determinar el efecto de la activación de la vía de interferón tipo I y del ácido palmítico en la modulación de la expresión de las citocinas pro-inflamatorias *Ifit1*, IL6, IL1 $\beta$  y la función fagocítica de la microglía *in vitro*.
- 4) Evaluar el efecto de la modulación de la vía de interferón tipo I en la microglía del NAc de la descendencia.
- 5) Confirmar la herencia transgeneracional del fenotipo adictivo y el estado de inflamación central y periférico en la descendencia F2 y F3 provenientes de padres adictos F1.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Tabla 1. Material biológico y no biológico.</b>	
<b>No Bilógico</b>	
• Pellets de chocolate (45mg, BioServ/ No. Catálogo F05472).	
• Comida estándar para rata (LabDiet/ No. Catálogo 5001).	
• Estuche de disección.	
• Mouse brain atlas, Paxinos y Watson.	
• Estereotáxico para ratas.	
• Guillotina para roedores.	
• Micropipetas eppendorf de 1000 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 10 $\mu$ l.	
• Puntillas para micropipetas: azules, amarillas y blanca, estériles.	
• Tubos eppendorf de 1.5 ml, 0.6 ml y 0.2, estériles.	
• Tubos Falcon 50ml y 15ml, estériles.	
• Guantes sin talco.	
• Placas de propileno de 384 pozos (Thermo Scientific/ No. Catálogo 4309)	
• Placas de cultivo de 96 pozos (Thermo Scientific/ No. Catálogo 167008)	
• Flasks Corning® T75 cm <sup>2</sup>	
• Perlas de latex fluorescentes (Sigma, L1030-1ML)	
• Tubos lila con EDTA (BD)	
<b>Biológico</b>	
• Ratas Wistar.	
Sexo: machos y hembras.	
Peso: 250-300 gramos.	
Edad: 8 – 10 semanas.	
• Línea celular de microglía: SIM-A9 ATCC (Manassas, VA, United States, CRL-3265)	



<b>Tabla 2. Reactivos.</b>
• RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104)
• TRIzol reagent (Invitrogen, 15596026)
• MILLIPLEX MAP Kit Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore Corporation, RECYTMAG-65K)
• Ketamina y Xilacina.
• Dulbecco's modified Eagle's médium, DMEM alto en glucosa 4.5 g/L, (Sigma-Aldrich, G8903 D5648)
• Suero fetal bovino (PAA Laboratories, A15-751)
• Suero de cabra (GIBCO, 16210064)
• Albumina sérica bovina libre de ácidos grasos (Equitech-Bio, BAH66-0100)
• Penicilina 50 Unidades/ml con 50 µg/ml Estreptomicina (Penicillin/Streptomycin, Sigma Aldrich, EE.UU, Missouri)
• Solución PBS/EDTA/EGTA/GLUCOSE (1 × /1 mM/1 mM/1 mg/ml)
• Solución PBS 1X + 0.1% Tritón X-100
• Poli-L-Lisina (Sigma, p4707)
• Paraformaldehído 4% (Sigma, 158127)
• Interferón alfa recombinante, IFN $\alpha$ (Abcam, AB95135)
• Ácido palmítico, PAL (Sigma-Aldrich, P9767)
• Solución salina al 0.9%.
• Agua DEPC estéril.
• RNaseZAP (Ambion, Inc./ No. Catálogo AM9780).
• 2-Mercaptoethanol (BioRad/ No. Catálogo 1610710).

<b>Tabla 3. Anticuerpos</b>
• Anti-mouse Iba-1 (1:200) (Abcam, ab178847)
• Anti-rabbit IgG conjugado con Alexa Fluor 546 (1:1000) (Invitrogen, A-11035)
• DAPI (Vector Laboratories, H-1000-10)
• Anti-IFNAR1 grado funcional (MAR1-5A3) (eBioscience, 16-5945-85)
• Anti- IgG de rata (Biolegend, 400402)
• Anti- IRF9

• Anti- STAT1
• Anti- IFNAR

<b>Tabla 4. Primers para RTqPCR</b>
• Primer para IL1 $\beta$ de rata: Integrated DNA Technologies/ Rn.PT.58.38028824; Exon 5-6
• Primer para IL6 de rata: Integrated DNA Technologies/ Rn.PT.58.13840513; Exon 4-5
• Primer para Ifit1 de rata: forward, 5'-CAAGGTGGAGAATGTTTGCAG-3'. reverse, 5'-CTCACAGTCTATCTCAGCACAC-3'.
• Primer para GAPDH de rata: forward, 5'-AACCCATCACCATCTTCCAG-3'. GAPDH reverse, 5'-CCAGTAGACTCCACGACATAC-3'.
• Primer para Ifit1 de ratón: forward, 5'-TTTCAAGTCCCTTCCGCTAC-3'. reverse, 5'-GTA CT CAGGGTTTTCTGGCTC-3'.
• Primer para IL1 $\beta$ de ratón: forward, 5'-GCAACTGTTCCCTGAACTCAAC-3'. reverse, 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'.
• Primer para IL6 de ratón: forward, 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC- 3'. reverse, 5'-TTGGTCAGCCACTCCTTC-3'.
• Primer para 36B4 de ratón: forward, 5'-TCCAGGCTTTGGGCATCA-3'. reverse, 5'- CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA-3'.

<b>Tabla 5. Equipo de laboratorio</b>
• Caja de acondicionamiento operante (OmniAlva).
• Sonicador Q125 (QSonica).
• Cabina de bioseguridad: Purifier Logic+ Class II (LABCONCO).
• Microcentrífuga 5417R (Eppendorf).
• NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).
• Vortex.
• Citómetro de flujo flow cytometer (BD Acuri C6 Plus)
• Microscopio confocal láser: Olympus BX61W1 con modulo laser de diodo FV1000.
• Termociclador para RTqPCR Lightcycler 480 system (Roche)
• Luminex® 200™ Multiplexing Instrument (Luminex Corp, LX200-XPON3.1)

### **i. Animales y mantenimiento**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar; machos y hembras de 8 – 10 semanas de edad y un peso entre 250 y 300 gramos. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura de 20–23 °C y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas; alimento y agua *ad libitum*, hasta comenzar los procedimientos experimentales. Todos los experimentos se realizaron con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL (No. BI20-00005). En este proyecto se emplearon 22 ratas hembras vírgenes y 11 machos.

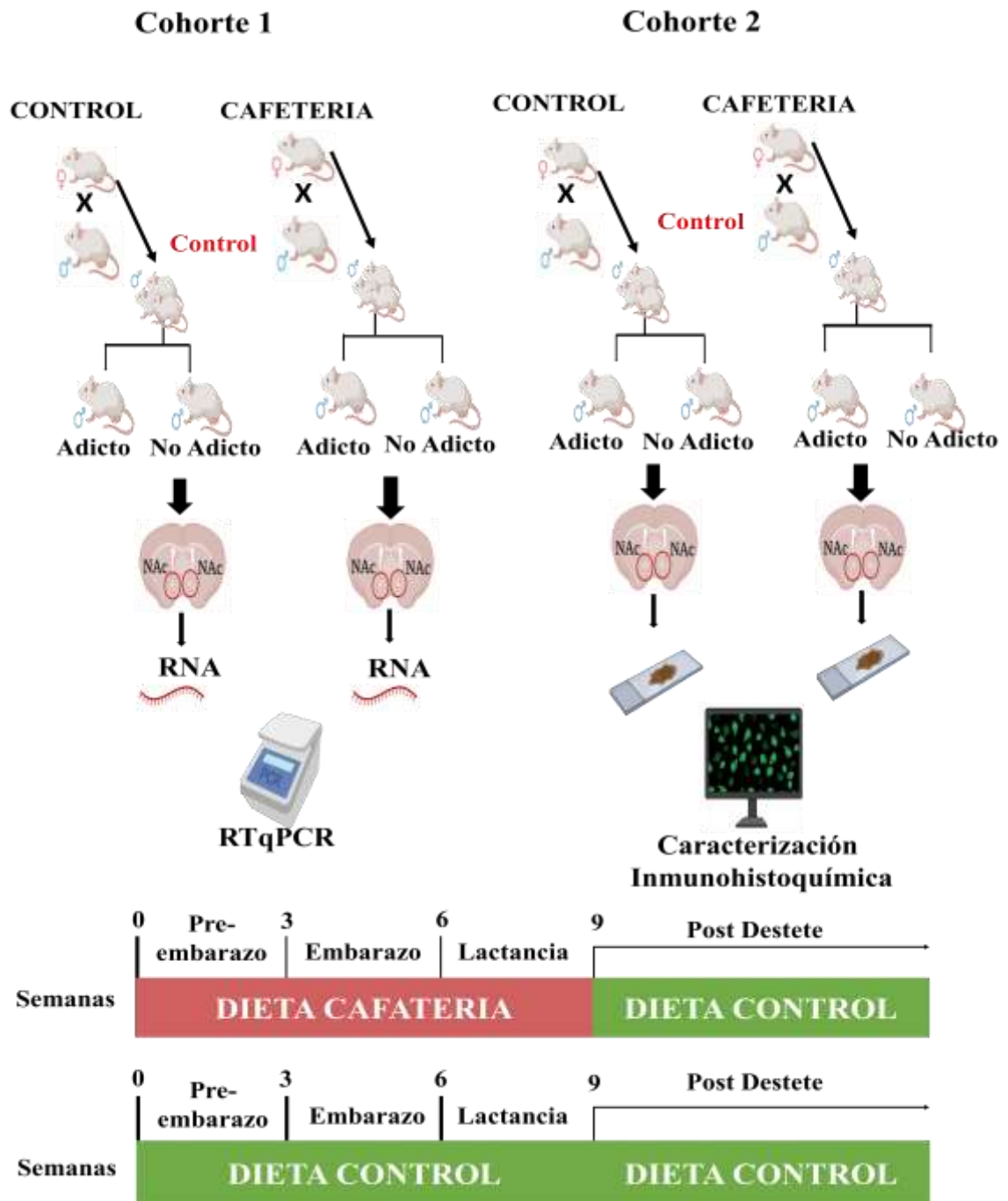
### **ii. Modelo de programación fetal con dieta de cafetería**

1. Las 22 ratas hembra se mantuvieron en condiciones estándar como se mencionó anteriormente hasta cumplir 8 o 10 semanas de edad.
2. Posteriormente, fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales: Control (n=8) o Cafetería (n=14).

Formulación de la dieta estándar (CD): la dieta control estándar contiene una densidad calórica de 3.35 kcal/g, dividida en 71% carbohidratos, 11% lípidos y 18% proteínas (Research Diets, New Brunswick, NJ, Cat. D12450B).

Composición de la dieta de cafetería (CAF): la dieta de cafetería posee un total de calorías de 3.72 kcal/g distribuidas en 39% carbohidratos, 49% lípidos, 12% proteínas y 513.53 mg de sodio. Esta dieta está formulada a base de: chocolate, galletas, tocino, papas fritas, pate de cerdo y dieta estándar en una proporción 1:1:1:1:1:2, respectivamente.

3. Las hembras asignadas a cada grupo comenzaron a ser alimentadas con dieta CD o CAF al cumplir 8 a 10 semanas de edad, por 3 semanas.
4. Al inicio de la cuarta semana de alimentación con dietas, las hembras fueron cruzadas con machos control (n=11) de 12-14 semanas de edad durante 2 días (Figura 5).
5. Después de dos días, los machos fueron retirados de la jaula de las hembras.
6. Las hembras fueron separadas en cajas individuales. Las del grupo control, continuaron siendo alimentadas con dieta CD por 6 semanas más, lo cual comprende el embarazo y la lactancia. Las hembras del grupo de cafetería, recibieron dieta de CAF por las mismas 6 semanas del embarazo y la lactancia (Figura 5).
7. Una vez cumplidas 9 semanas de alimentación con dieta CD o CAF (pre-cruza: 3 semanas, embarazo: 3 semanas y lactancia: 3 semanas), las crías fueron destetadas al día 21 postparto.
8. Las crías de ambos grupos CD y CAF fueron separadas en grupos de 10 a 12 animales y se les alimentó con dieta CD hasta cumplir dos meses de edad (8 a 10 semanas de edad) (Figura 5).
9. A los 2 meses de edad, las crías fueron sometidas a la evaluación del comportamiento adictivo, mediante condicionamiento operante en cajas tipo Skinner.



**Figura 5. Modelo de programación fetal nutricional y cohortes experimentales.** Esquema gráfico de las cohortes de animales utilizadas para los distintos objetivos del proyecto. Cohorte 1: hembras control (n=8) y cafetería (n=14) cruzadas con 11 machos control para obtención de generación de machos F1; utilizados para pruebas de expresión génica por RTqPCR y citocinas plasmáticas por Bioplex. Cohorte 2: hembras control (n=2) y cafetería (n=2) cruzadas con 2 machos control para obtención de generación de machos F1; utilizados para análisis de inmunohistoquímica y morfología de células de microglía.

### iii. Prueba de condicionamiento operante

1. Grupos de 10 a 12 machos (F1) descendientes de las hembras CD o CAF, fueron colocados en jaulas individuales.
2. Los animales se dejaron por 7 días sin ser manipulados para su aclimatación con acceso *ad libitum* a dieta estándar y agua.
3. Posterior al periodo de aclimatación, todos los animales fueron expuestos a restricción calórica durante 7 días, para reducir el 70% de su ingesta diaria de alimentos y alcanzar decremento del 5 - 10% del peso corporal total. Diariamente los animales fueron alimentados con 15 gramos en promedio de alimento estándar. Esta manipulación permitió la adquisición de una respuesta eficiente al presionar la palanca de estimulación durante el entrenamiento de condicionamiento operante.
4. Después de los 7 días de restricción calórica, los animales se entrenaron individualmente siguiendo los protocolos FR1, FR5 y PR, con los parámetros de asociación: 2 segundos de luz y 2 segundos de sonido con 5 segundos de interensayo, ajustados a la liberación del pellet en el receptáculo de la caja Skinner (Figura 6A).
5. Para el entrenamiento de condicionamiento operante, los animales son colocados individualmente en la caja Skinner por el tiempo correspondiente a cada protocolo empleado (FR, FR5 o PR) (Figura 6B).

Protocolo FR1. Durante este protocolo las ratas se entrenan para presionar una palanca la cual, al ser accionada una sola vez, libera un pellet de chocolate (BioServ, F05472). La acción de la palanca tiene un tiempo de espera de 5 segundos, entre cada liberación. Cada sesión de entrenamiento del protocolo FR1, tiene tiempo máximo de duración de 1 hora por

sesión en donde es posible alcanzar 100 acciones de la palanca o liberaciones de pellets. Durante este periodo de entrenamiento las ratas son alimentadas con 30 gramos de alimento estándar diarios, que se colocan una vez terminado el entrenamiento (Figura 6B).

Protocolo FR5. Durante este protocolo la liberación de pellets está condicionada a cinco presiones de la palanca activa, lo cual aumenta el reto para la obtención de la recompensa. La duración del protocolo es de 4 días, con sesiones de 1 hora. Durante este protocolo las ratas tienen acceso libre *ad libitum* a alimento estándar y agua (Figura 6B).

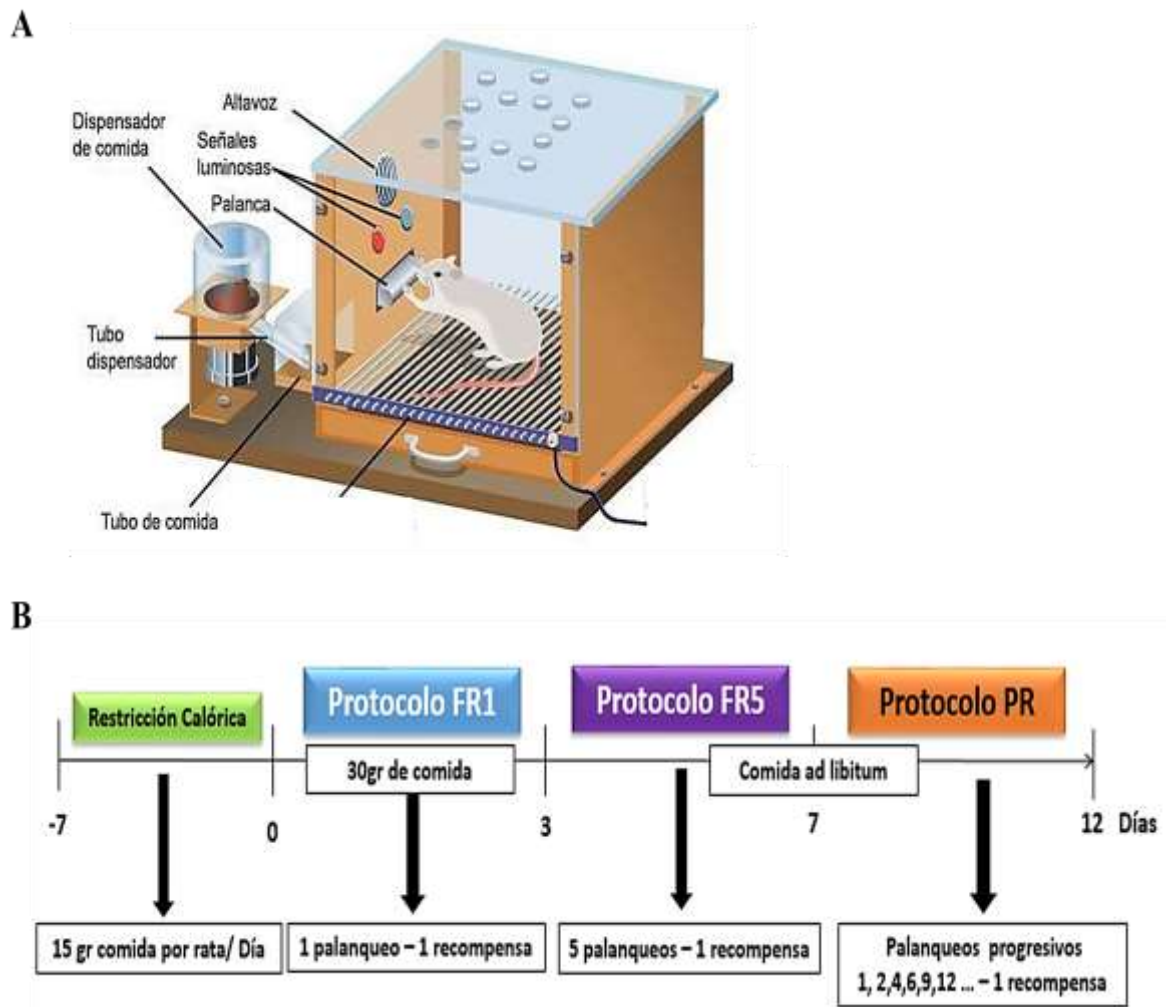
Protocolo Progresivo o PR. La evaluación del comportamiento durante este protocolo se lleva a cabo como lo hemos reportado anteriormente (Camacho et al. 2017; Cruz-carrillo et al. 2020), empleando la siguiente fórmula:  $PR = [5e (R \times 0.2)] - 5$ , donde R es igual al número de recompensas ganadas más 1 (es decir, siguiente refuerzo). Por lo tanto, el número de respuestas necesarias para obtener una recompensa debe de seguir el orden: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, etc. Este protocolo tiene una duración de 5 días con sesiones de máximo 1 hora. El tiempo de la sesión puede variar ya que, un periodo de inactividad (no presionar la palanca) en un período de 10 minutos da como resultado la terminación de la sesión. Durante este protocolo las ratas tienen acceso libre *ad libitum* a alimento estándar y agua (Figura 6B).

Cálculo de puntuaciones para motivación e ingesta durante prueba de condicionamiento operante. El comportamiento similar a la adicción y no similar a la adicción en los sujetos descendientes de madres expuestas a dieta CD o CAF, se diagnosticó mediante la integración de presiones de palanca durante los protocolos FR5 y PR, como se ya se reportó

anteriormente (Cruz-carrillo et al. 2020; Le et al. 2017). Usamos la formula  $x = \frac{X_i - X}{s.d.}$ , donde  $X_i$  es el valor del comportamiento de cada rata,  $X$  es el valor del comportamiento medio de todas las ratas y S.D. es la desviación estándar del valor del comportamiento de la población. Determinamos un comportamiento similar a la adicción y no similar a la adicción en la descendencia mediante la relación FR5 / PR estableciendo una puntuación de +0,5 o -0,5 en cuadrante de la "x" (puntuación de ingesta) e "y" (puntuación de motivación) para caracterizar la adicción. Este análisis nos permite establecer los puntajes de ingesta y motivación para cada sujeto y así poder clasificarlos en altos y bajos respondedores (adictos o no adictos) para recompensas.

Al término de cada sesión los animales se regresan a su jaula y se alimentan con la cantidad de dieta estándar que corresponde al protocolo. Entre cada animal, se limpió la caja con etanol al 70% para evitar rastros olfativos que pudieran influir en el protocolo de entrenamiento. Al final del entrenamiento, se realiza los cálculos y evaluación del comportamiento de los animales y se procede al sacrificio de los mismos.





**Figura 6.** A) Imagen de los componentes de la caja Skinner. B) Esquema gráfico de los protocolos de condicionamiento operante: periodo de restricción calórica (7 días), protocolos de condicionamiento FR1 (3 días), FR5 (4 días) y PR (5 días); tiempo total del entrenamiento 12 días.

#### **iv. Sacrificio y obtención de muestras**

Los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina posterior a cada entrenamiento. Al ser decapitados, inmediatamente se colectaron 4 mililitros de sangre en tubos con EDTA para ser empleados en la obtención de leucocitos y plasma. Se obtuvo el cerebro completo de cada animal, el cual fue congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  inmediatamente en hielo seco. La región del NAc, fue aislada 24 horas después siguiendo las coordenadas de localización de la región que se especifican en el “Mouse brain atlas” de Paxinos y Watson. El resto del cerebro fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y la región del NAc se colocó en el tubo de 1.5 ml para proceder con la extracción de RNA.

#### **v. Aislamiento de RNA**

##### *a) Aislamiento de RNA de tejido.*

1. El tejido del NAc aislado y colocado en tubos de 1.5ml fueron procesados con los reactivos del kit RNeasy Mini Kit de Quiagen, para el aislamiento y purificación del RNA.
2. Se agregó  $300\mu\text{l}$  del buffer RLT con  $\beta$ -mercaptoetanol ( $10\mu\text{l}$  de  $\beta$ -ME por cada 1 ml de Buffer RLT).
3. Las muestras fueron posteriormente homogenizadas mediante sonicación utilizando parámetros de: 15 segundos a 30% de amplitud y 5 pulsos) y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos.
4. Se aisló el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5ml y se agregaron  $300\mu\text{l}$  de etanol grado molecular al 70%.

5. La solución se homogenizó y se vertió a una columna de aislamiento del kit RNeasy Mini Kit.
6. Las columnas con la muestra fueron centrifugadas por 15 segundos a 10,000 rpm y se descartó el líquido colectado en el tubo adjunto a la columna.
7. Se añadieron 700µl de buffer RW1 a cada columna y posteriormente fueron centrifugadas por 15 segundos a 10,000 rpm.
8. Se descartó el líquido colectado en el tubo adjunto a la columna y se agregaron 500 µl de buffer RPE a cada columna y se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm.
9. Se descartó el líquido colectado en el tubo adjunto a la columna y se agregaron nuevamente 500 µl de buffer RPE a cada columna y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm.
10. Se descartó el líquido eluido y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 30 µl de agua DEPC a cada columna para eluir el RNA mediante centrifugación por 1 min a 10,000 rpm. Este paso se repitió dos veces utilizando el mismo eluido para pasarlo por la columna.
11. El RNA aislado fue almacenado a -80°C hasta su uso en RTqPCR.

b) Aislamiento de RNA de cultivo celular.

1. Posterior al ensayo de estimulación con IFN $\alpha$  y PAL, se retiró el medio de cultivo de los pozos de las placas.
2. Las placas fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, se agregó 1ml de Trizol a cada pozo y se colectaron las células por raspado en un tubo de 1.5ml y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente.

3. A cada tubo se le agregaron 200µl de cloroformo y se mezclaron por vortex durante 15 segundos y se dejaron incubando durante 3 min a temperatura ambiente.
4. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 4°C por 15 minutos a 14,000 rpm y se colectó la fase acuosa (fase superior de tres) y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5ml.
5. Se añadieron 500µl de isopropanol frío a cada tubo y se mezclaron por 20 segundos y se dejó incubar a -20°C toda la noche.
6. Después de 24 horas, las muestras fueron centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante se descartó y los pellets fueron resuspendidos en 500µl de etanol frío al 75%, para su lavado.
7. Después de cada lavado las muestras fueron centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 14,000 rpm y se repitieron los pasos 6 y 7 dos veces más.
8. Después de la última centrifugación (lavado) el sobrenadante fue descartado y se retiró el exceso de etanol con una micropipeta.
9. Los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos y se resuspendieron en 50µl de agua DEPC.
10. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso en RTqPCR.

**vi. PCR en tiempo real (RTqPCR)**

1. Cada una de las muestras de RNA fueron cuantificadas en el NanoDrop 8000 utilizando 1µl de cada muestra y ajustadas a 200ng de RNA total inicial en 10µl.
2. Se realizó la retrotranscripción del RNA empleando el kit High-Capacity cDNA reverse transcription kit with RNase Inhibitor.

3. Se preparó un master mix con las cantidades de los reactivos para transcripción necesario para el total de muestras a procesar más el 5% de excedente para pérdidas durante pipeteo.

Contenido del Master mix para 1 sola muestra: 2.0µl de buffer RT 10X, 0.8µl de dNTPs 20X, 2.0µl de primers RT, 1.0µl de la enzima multiscript RT, 1.0µl del inhibidor de RNase y 3.2µl de agua DEPC.

4. La reacción de RT en el termociclador consistió del siguiente esquema: 10 minutos a 25° C, 120 minutos a 37° C y 5 min a 85° C.
5. Posteriormente a la retrotranscripción, se realizó la cuantificación del cDNA y se preparó el Master mix para la RTqPCR.

Contenido del Master mix de RTqPCR para 1 sola muestra: 5.0µl de iQTM SYBR® Green SuperMix (este ya contiene la enzima, dNTPs y sales necesarias para la reacción de PCR), 2.0µl de agua DEPC y 1µl de cada primer con una concentración de 0.5 µM.

6. Para cada mezcla de reacción de 9µl se agregó 1µl de cDNA y se siguió un programa de amplificación que comprenden 50 ciclos de: 95 ° C durante 10 segundos, 60 ° C durante 20 segundos y 72 ° C durante 10 segundos en el termociclador a Lightcycler 480.
7. Todas las reacciones de RTqPCR se analizaron utilizando el método comparativo Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

## **vii. Cultivo celular de microglía y tratamientos**

1. Se descongeló una alícuota de células de la línea celular de microglía SIM-A9, en baño maría a 37°C y se transfirió a un flask de 75 cm<sup>2</sup> con 25ml de medio DMEM alto en glucosa 4.5 g/L, suplementado con 10% v/v de suero inactivado de caballo, 10% v/v de suero inactivado de suero fetal bovino y 50 unidades/ml de penicilina con 50 µg/ml de estreptomicina.
2. Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 70-90%.
3. Posteriormente, las células fueron despegadas del flask utilizando una proporción 1:4 de la solución de PBS/EDTA/EGTA/GLUCOSA (1 × /1 mM/1 mM/1 mg/ml) y dejando incubar a 37°C por 1–5 minutos y se centrifugaron a 2000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 5ml de medio DMEM para realizar un lavado por pipeteo suave y se volvieron a centrifugar a 2000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Se descartó el sobrenadante, y el pellet de células fue resuspendido en 1ml de medio DMEM, se tomaron 10µl de resuspendido y se agregaron 3µl de azul tripan para realizar el conteo de células en cámara de Neubauer.
6. Se sembraron 200,000 células por pozo en placas de 96 pozos en medio DMEM y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
7. Se añadió a cada pozo 200ng de INF $\alpha$  solubilizado en PBS 1X o 100µM de ácido palmítico solubilizado en DMEM con BSA al 10% y se incubó por 6 o 24 horas.
8. Posterior a la incubación, se retiró el medio de cultivo de los pozos y se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se extrajo el RNA con Trizol como se describió.
9. El RNA aislado fue almacenado a -80°C hasta su uso en RTqPCR.

### **viii. Ensayo cualitativo de fagocitosis en microglía**

1. Se sembraron 150,000 células de la línea celular SIM-A9 en placas de 6 pozos recubiertas con 0.01% poly-L-lisina y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
8. Se añadió a cada pozo 200ng de INF $\alpha$  solubilizado en PBS 1X o 100 $\mu$ M de ácido palmítico solubilizado en DMEM con BSA al 10% y perlas de latex fluorescentes (marcadas con FITC) ya pre-opsonizadas con suero fetal bovino, alcanzando una concentración de perlas en el pozo de 0.1% (v/v). La pre-opsonización de las perlas se realizó con suero fetal bovino a una relación 1:5 y mediante incubación a 37°C por 1 hora. Todo esto como ya se reportó anteriormente (Cruz-carrillo et al. 2020).
9. Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 6 o 24 horas y las células fueron fijadas utilizando paraformaldehído al 4% e incubando por 10 minutos a 37°C.
10. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se permeabilizaron con PBS 1X + 0.1% Tritón X-100 (PBST) por 10 minutos.
11. Se agregó PBST + 10% suero de cabra para bloquear las células por 30 minutos y se lavaron 3 veces con PBS 1X.
12. Se agregó a cada pozo anticuerpo primario anti-mouse Iba-1 (1:200) y se dejó incubando toda la noche a 4°C.
13. Se lavaron 3 veces con PBS 1X y se agregó anticuerpo secundario anti-rabbit IgG acoplado con Alexa Fluor 546 (1:1000) por 2 horas a temperatura ambiente.  
  
Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se montaron en VECTASHIELD mounting medium con DAPI y analizadas en el microscopio confocal Olympus BX61W1 microscope with an FV1000 module with diode laser.
14. El análisis de las imágenes fue realizado mediante el software ImageJ.

**ix. Ensayo cuantitativo de fagocitosis en microglía**

1. Se sembraron 150,000 células de la línea celular SIM-A9 en placas de 6 pozos recubiertas con 0.01% poly-L-lisina y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Posteriormente, se le añadió a cada pozo: 200ng de IFN $\alpha$  o 100 $\mu$ M de ácido palmítico y perlas de latex fluorescentes (marcadas con FITC) como se describió (Cruz-carrillo et al. 2020) y se incubaron por 6 o 24 horas.
5. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X y se despegaron de las placas empleando una proporción 1:4 de la solución de PBS/EDTA/EGTA/GLUCOSA (1  $\times$  /1 mM/1 mM/1 mg/ml) y dejando incubar a 37°C por 1–5 minutos y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se descartó en sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en 100  $\mu$ l de PBS 1 y se analizaron por citometría de flujo en el citómetro BD Acuri C6 Plus en el canal FL1-A.

**x. Cuantificación de citocinas en plasma**

1. A partir de la sangre colectada del grupo de machos F1, F2 y F3 de los grupos experimentales CD y CAF se aisló el suero y 100 $\mu$ l de solución se utilizaron para realizar el análisis de citocinas por BIOPLEX.
2. El análisis se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante para el kit MILLIPLEX MAP Kit Rat Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel, que evalúa los niveles de IL-6, IL-10, IL-12(p70), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and MCP-1.



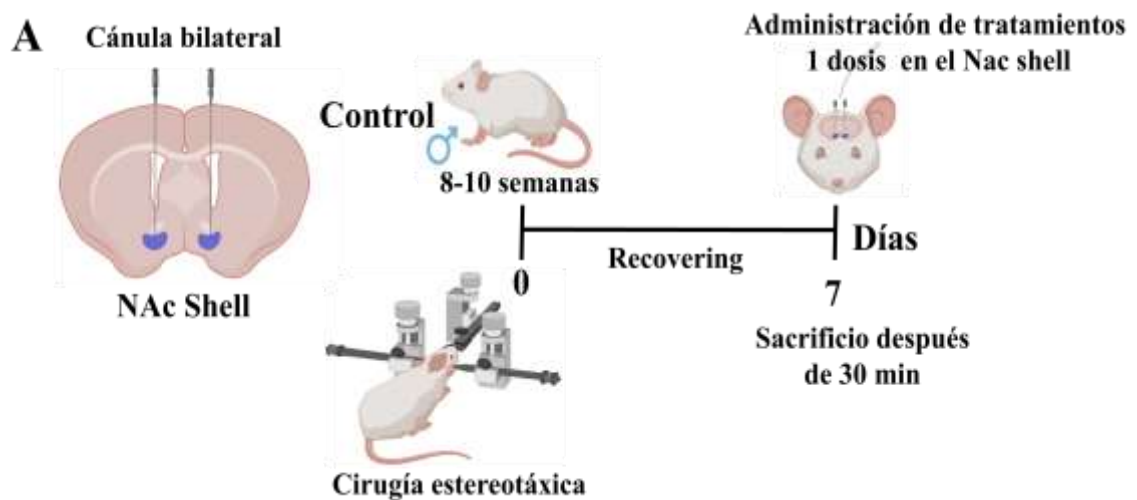
3. La lectura de los datos se realizó en el equipo Luminex® 200™ Multiplexing Instrument.
4. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante comparación múltiple empleando ANOVA de una vía y una  $p < 0.05$  para la significancia.

#### **xi. Cirugía estereotáxica**

1. Para realizar las cirugías se emplearon ratas de la cepa Wistar de un peso entre 260g y 280g (aproximadamente 8 a 10 semanas de edad).
2. Los animales fueron sedados con ketamina 10 mg/kg + xilacina 2 mg/kg vía intraperitoneal. Se esterilizó la zona de la cabeza empleando Iodo y posteriormente realizó una incisión en la piel empleando bisturí a partir de lambda y hasta los ojos de la rata.
3. Empleando un estereoscopio se ubicó Bregma y con referencia al atlas de Paxinos y Watson, se identificaron las coordenadas del NAc: AP +1.6, ML  $\pm 0.6$ , DV -6.7, Se lubricó el cráneo con vaselina con la finalidad de impedir el sobre calentamiento del hueso y se realizó un trepano con un taladro hasta llegar a la duramadre y se insertó un tornillo de anclaje.
4. Se implantaron dos cánulas para cada uno de los hemisferios: izquierdo y derecho del NAc y se recubrió el área con acrílico dental (Figura 7).
5. Las ratas fueron saturadas con aguja e hilo de cirugía y finalmente se colocaron en jaulas individuales por 7 días para su recuperación antes del tratamiento con IFN $\alpha$  (Figura 7).

## xii. Inyección central en la región del NAc shell

1. Una vez pasado el periodo de recuperación (7 días) a los animales se les administró de manera bilateral con IFN $\alpha$  (2000U, una sola dosis), anti-IFNAR (3 $\mu$ g, una sola dosis) y anti-IgG Isotipo (3 $\mu$ g, una sola dosis) a través de las cánulas en un volumen de 3 $\mu$ l administrado a un flujo de 2 $\mu$ L/min (Figura 7).
2. Posteriormente a los 30 minutos después de la administración de los tratamientos, los animales fueron sacrificados y sometidos a perfusión intracardiaca para la fijación del tejido cerebral.
3. La región contralateral al NAc shell (no administrada con IFN $\alpha$ ) fue utilizada como control para evaluar el efecto de la activación de la vía del interferón tipo I y se compararon controles y cafetería con Isotipo contra CD y CAF con anti-IFNAR para evaluar el efecto del bloqueo de la vía del interferón tipo I en el comportamiento motivante.



**Figura 7.** Imagen representativa de la región del NAc shell para la implantación de cánulas en el hemisferio izquierdo y derecho. Esquema gráfico del procedimiento de cirugía estereotáxica, tiempos y dosis de tratamientos.

### **xiii. Perfusión intracardiaca**

1. Los animales fueron sacrificados por sobredosis con 1 ml de pentobarbital (PiSA Agropecuaria) administrado intraperitonealmente y se realizó una disección desde el abdomen hasta la parte superior de la cavidad torácica exponiendo el corazón.
2. Se perforó el ventrículo izquierdo con un catéter conectado a una manguera y se realizó un corte en el atrio derecho para abrir la circulación.
3. Los animales fueron perfundidos con 250 ml de PBS 0.1M + 10 U/ml de heparina, seguido de paraformaldehído 4% en PBS 0.1M, utilizando una bomba Fisher Scientific GP1000 con un flujo de 15ml/min durante 20 min, y se extrajo a los cerebros extraídos y se les colocó en paraformaldehído 4% + PBS 0.1 M y se almacenaron a 4 °C por 24 horas.
4. Después de 24 horas los cerebros fueron cambiados de paraformaldehído a sacarosa 10%, 20%, y 30%. Los cerebros permanecieron en sacarosa 30% a 4°C hasta ser cortados.

### **xiv. Inmunofluorescencia**

1. Los cerebros fueron seccionados en cortes de 30µm utilizando las coordenadas (AP: +2.5, ML: -1.4, DV:-6.3) para localizar la región del NAc.
2. Los cortes fueron lavados 3 veces con 1X PBS + 0.1% TritonX-100 (PBST), se bloquearon con PBST + 10% suero de cabra + 10% suero de caballo a temperatura ambiente por 1 hora y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Iba1 1:200 (ab178847, abcam, Cambridge, MA, USA) y anti-IRF9 a 4 °C por 48 horas.

3. Los cortes fueron lavados 3 veces con PBST e incubados por 2 horas con el anticuerpo secundario Alexa fluor anti-rabbit 1:1000 (A-11034, Invitrogen) diluido en PBST + 1% suero de cabra + 1% suero de caballo.
4. Después de la incubación los cortes fueron lavados 3 veces con PBST y se dejaron secar a temperatura ambiente y los cortes fueron montados usando Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en portaobjetos.

**xv. Análisis morfológico de la microglía.**

1. La morfología de la microglía fue analizada empleando el programa ImageJ con los plugins AnalyzeSkeleton (2D/3D) y FracLac siguiendo el protocolo descrito por Young and Morrison (2018).
2. Se seleccionaron y analizaron minuciosamente tres micrografías aleatorias por grupo; los gráficos muestran los endpoints por célula, la longitud de las ramificaciones por célula y la dimensión fractal.

**xvi. Modelo de herencia transgeneracional del comportamiento adictivo.**

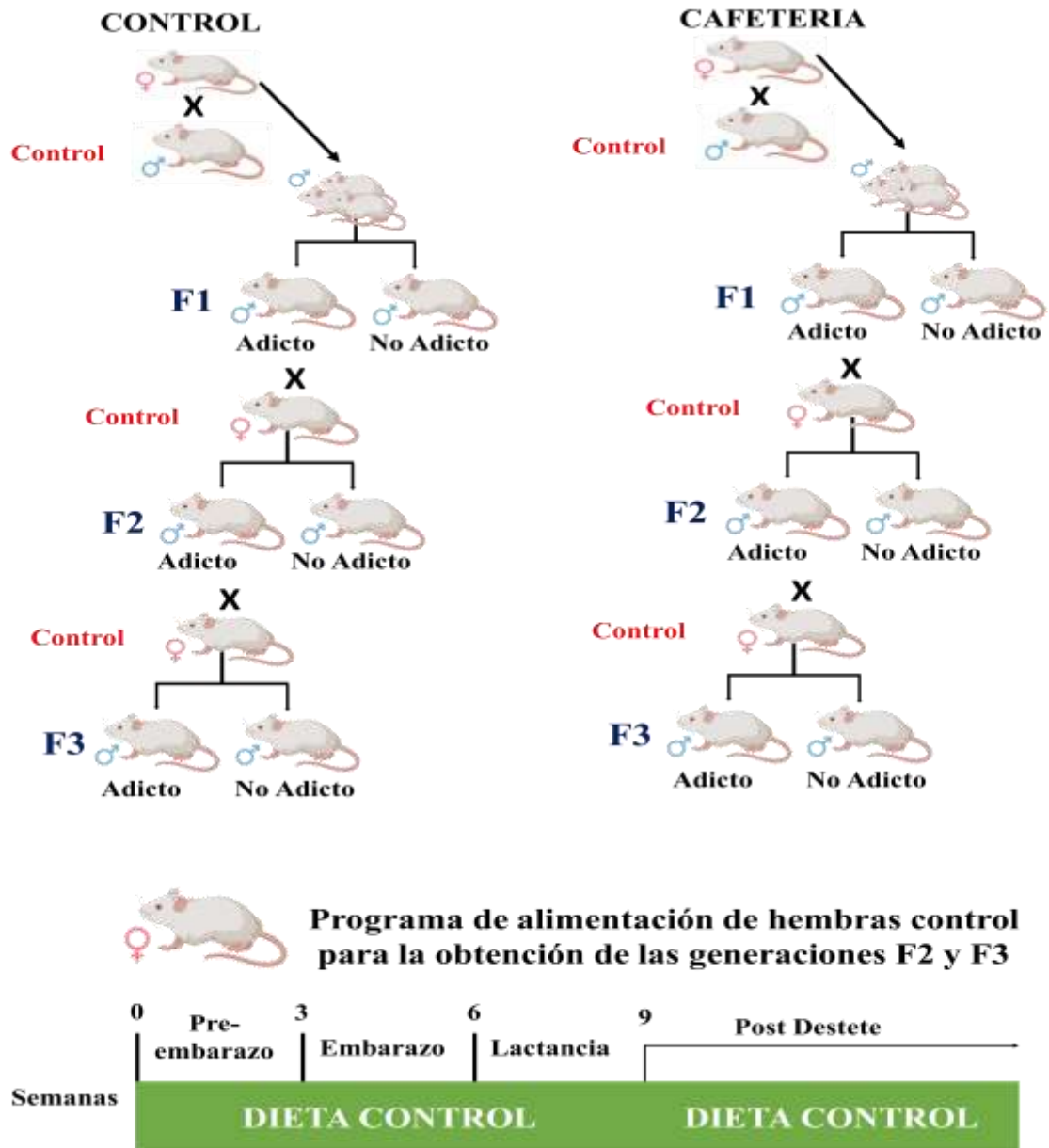
Generación F2

1. Se seleccionaron 2 machos F1 de cada grupo experimental CD (n=2) y CAF (n=2), con los comportamientos de motivación más altos y por lo tanto diagnosticados con un comportamiento de adicción.

2. Cada uno de los machos se cruzó con hembras vírgenes ( $n = 3$ / cada macho) de 10 semanas de edad por 2 días. Los machos fueron retirados de la jaula de las hembras y se confirmó la cópula mediante la presencia de tapón vaginal.
4. Las hembras preñadas fueron alojadas individualmente y alimentadas con dieta estándar durante el embarazo y la lactancia.
5. A 21 días postparto, las crías fueron destetadas y se colocaron en cajas con 2 a 3 animales y se mantuvieron con la dieta estándar hasta cumplir las 8 o 10 semanas de edad para llevar a cabo las pruebas de condicionamiento operante (Figura 8).

### Generación F3

1. Se seleccionaron 2 machos F2 de cada grupo experimental CD ( $n=2$ ) y CAF ( $n=2$ ), con los comportamientos de motivación más altos y por lo tanto diagnosticados con un comportamiento de adicción.
2. Cada uno de los machos se cruzó con hembras vírgenes ( $n = 3$ / cada macho) de 10 semanas de edad por 2 días. Los machos fueron retirados de la jaula de las hembras y se confirmó la cópula mediante la presencia de tapón vaginal.
4. Las hembras preñadas fueron alojadas individualmente y alimentadas con dieta estándar durante el embarazo y la lactancia.
5. A 21 días postparto, las crías fueron destetadas y se colocaron en cajas con 2 a 3 animales y se mantuvieron con la dieta estándar hasta cumplir las 8 o 10 semanas de edad para llevar a cabo las pruebas de condicionamiento operante (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema gráfico del modelo de herencia transgeneracional del comportamiento adictivo. Generación de la descendencia de machos F2 y F3, provenientes de padres adictos, cruzados con hembras control y mantenidas en alimentación con dieta estándar (CD) para evitar segunda exposición al estímulo inicial y evaluar su potencial de herencia.

## **xvii. Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM para todos los datos. Todos los análisis estadísticos, incluida la prueba de la normalidad de la distribución de datos, se realizaron utilizando GraphPad Prism 7.01 y se consideró significativo un valor de p corregido menor a 0.05. Se probó la normalidad de todos los resultados mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para la expresión génica diferencial mediante RTqPCR y los ensayos de fagocitosis, usamos un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para la diferencia entre 2 grupos en el análisis morfológico, utilizamos una prueba de T-student no pareada. Finalmente, para diferenciar entre altos y bajos respondedores durante el condicionamiento operante, usamos la fórmula  $x = X_i - X / s.d$  y la relación FR5 / PR como ya se reportó anteriormente (Cruz-carrillo et al., 2020).

## VII. RESULTADOS

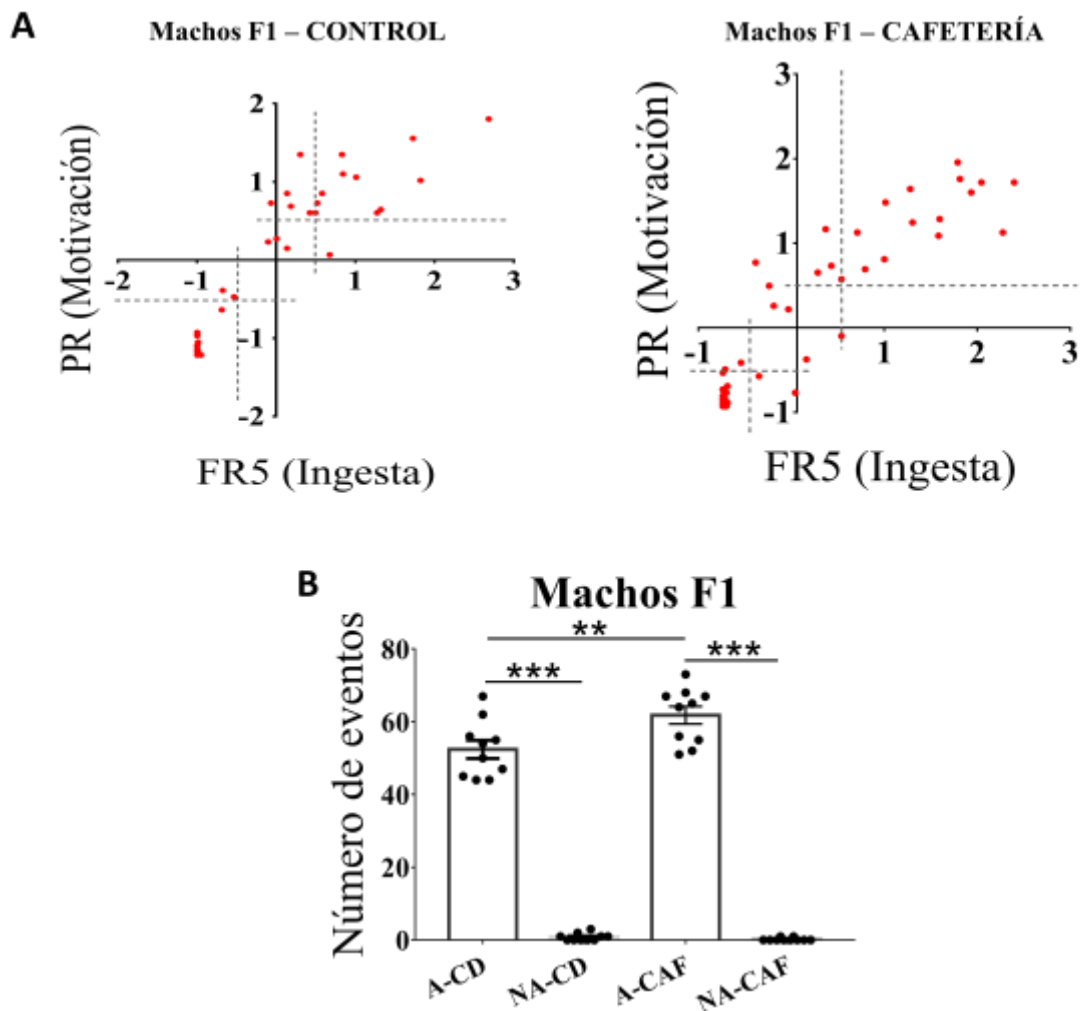
### **i. Efecto de la exposición a dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia en el comportamiento adictivo hacia la comida de la descendencia (machos F1).**

Se evaluó el comportamiento motivante (compulsivo-similar al adictivo), de un total de 89 machos F1, descendientes de hembras programadas con dieta control (CD=36) y dieta de cafetería (CAF=53). Diagnosticamos el comportamiento similar a la adicción en la descendencia F1 mediante entrenamiento operante basado en el número de presiones de palanca para recompensas naturales (pellets de chocolate), utilizando las puntuaciones de motivación (PR) e ingesta (FR5). Clasificamos el comportamiento similar a la adicción (adictos) y no similar a la adicción (no adictos) en la descendencia F1 por la relación de los resultados obtenidos en FR5/PR estableciendo una puntuación de corte de +0.5 o -0.5 en los ejes "x" e "y", respectivamente.

Los datos generados demuestran que existen dos poblaciones de machos con comportamientos adictivos distintos, dentro de ambos grupos experimentales CD y CAF. Tanto en el grupo control como en el grupo de cafetería, existen sujetos que muestran una alta respuesta (cuadrante superior derecho) y otros con una baja respuesta (cuadrante inferior izquierdo) a la presión de la palanca durante los protocolos FR5/PR. Sin embargo, los descendientes de hembras alimentadas con dieta CAF existen más sujetos altos respondedores (A-CAF: n=15) o con un comportamiento similar a la adicción, en comparación con los descendientes del grupo control (A-CD: n=10) (Figura 9A). La comparación de comportamiento empleando solo los datos generados del protocolo PR, confirman una mayor motivación por la obtención de recompensas calóricas en los descendientes adictos del grupo de CAF (A-CAF), comparados con los sujetos adictos del



grupo control (A-CD). No se encontraron diferencias significativas entre los machos no adictos de ambos grupos NA-CD y NA-CAF (Figura 9B). Esta evidencia confirma que la ingesta de una dieta hipercalórica durante el embarazo programa a la descendencia, hace más susceptible a mostrar un mayor comportamiento similar al adictivo hacia recompensas naturalmente apetecibles.



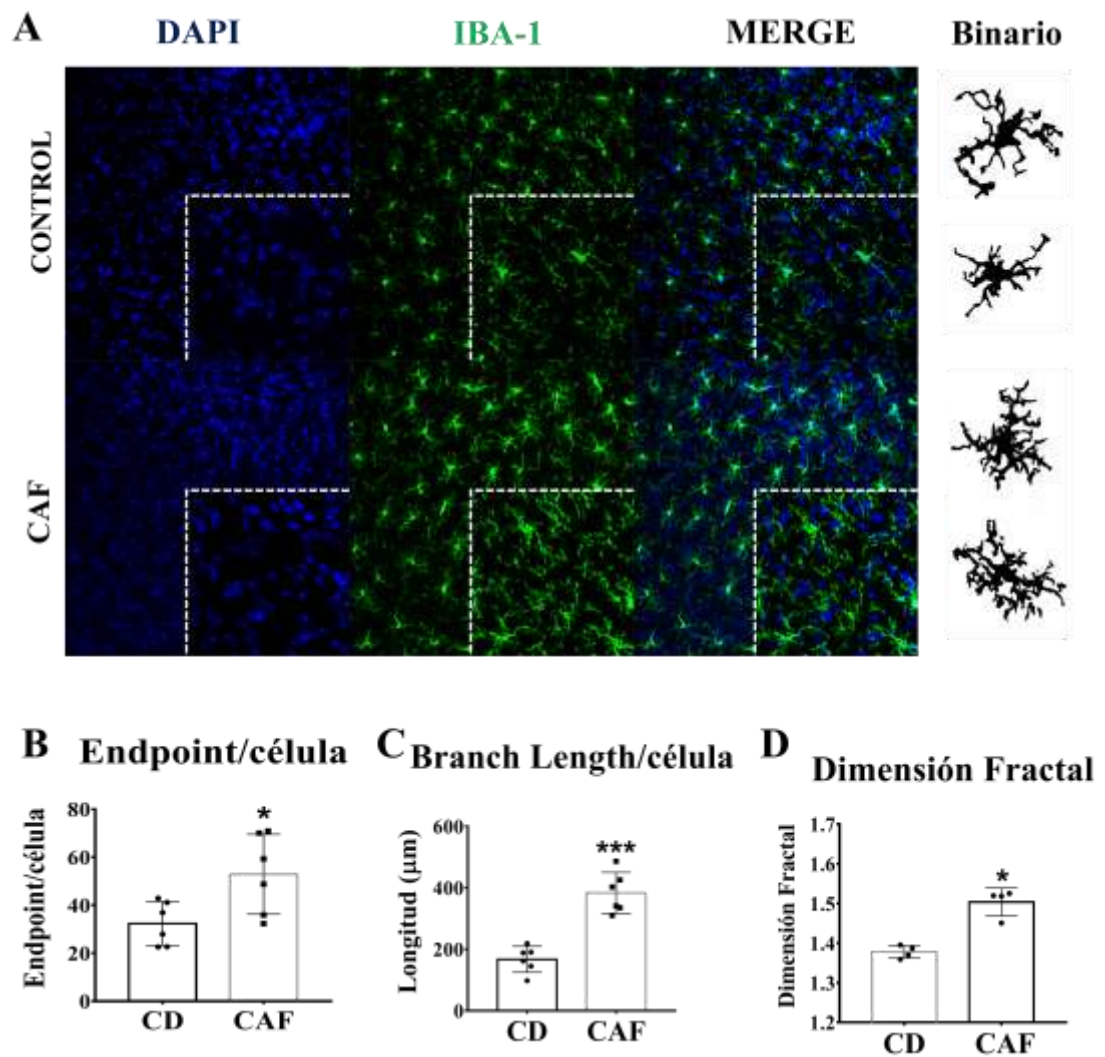
**Figura 9. La programación por dieta de cafetería programa a la descendencia a presentar un comportamiento similar a la adicción.** A) Identificación de conductas similares a la adicción y no similar a la adicción en la descendencia, utilizando el índice de puntuación de ingesta (FR5) y motivación (PR) (FR5 / PR) estableciendo una puntuación de corte +0,5 o -0,5 en "x" y "y", respectivamente. CD: n=53; CAF: n=36. B) Comparación estadística del comportamiento operante en PR de machos CAF (adictos n=10; no adictos n=10) y machos CD (adicto n=10; no adicto n=10). Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM y \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , después de usar ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

**ii. La programación nutricional materna induce cambios morfológicos en la microglía que sugieren la activación y estado reactivo de la misma en el NAc de la descendencia**

**F1**

En estudios previos de nuestro equipo de investigación hemos reportado que la exposición materna a dieta CAF durante el embarazo y la lactancia, promueve la activación de las células de microglía en el hipotálamo de la descendencia, lo cual correlacionó con incremento en la ingesta de dieta de cafetería (Maldonado-Ruiz et al. 2019). Por lo tanto, en este proyecto, nos propusimos evaluar si la exposición a una dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia promueve la activación de la microglía en el NAc de la descendencia, lo cual pudiera asociarse al desarrollo de neuroinflamación y un comportamiento similar al adictivo.

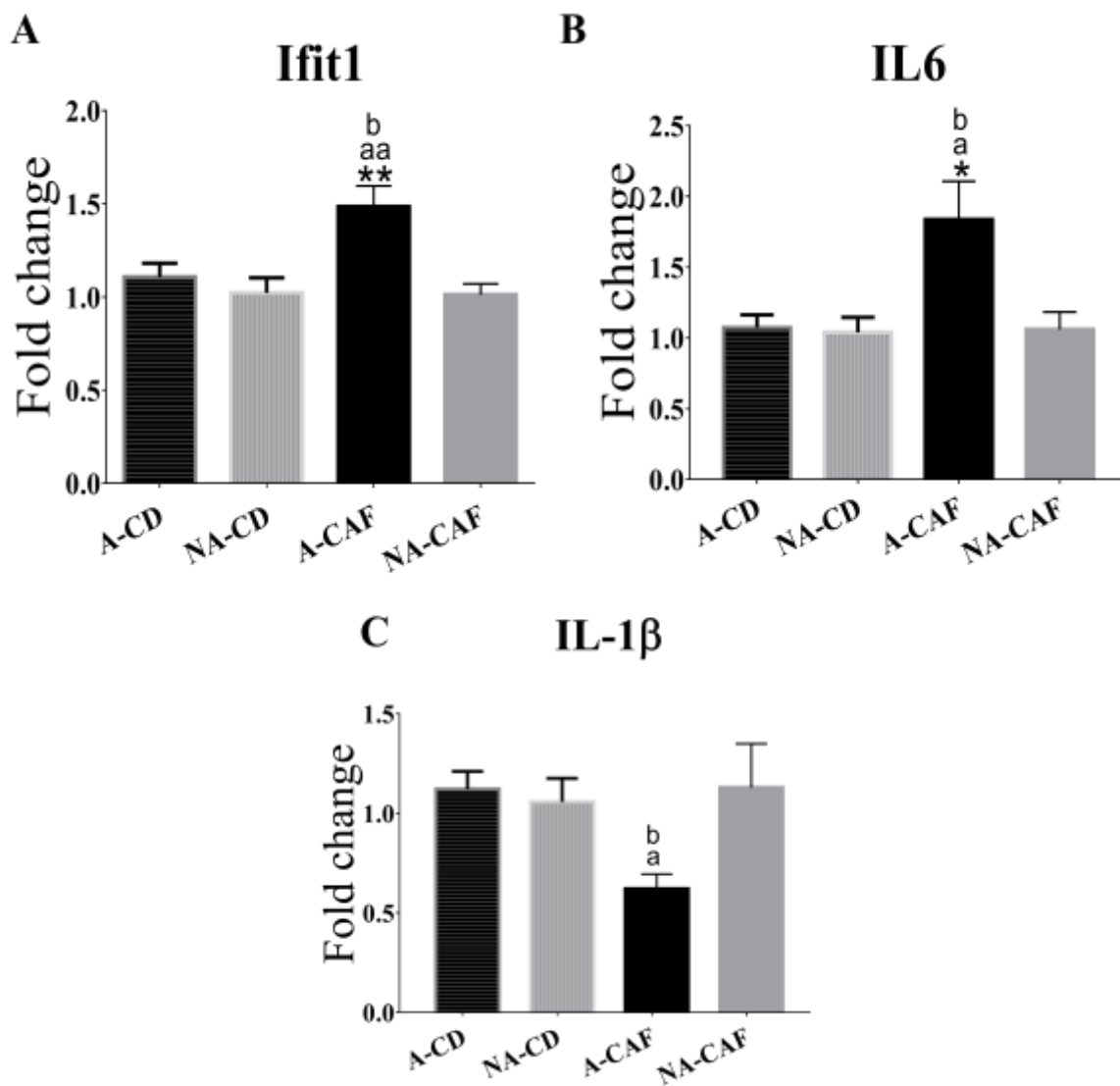
Para evaluar lo anterior, seleccionamos 3 machos F1 CD y 6 machos F1 CAF, los cuales fueron perfundidos con paraformaldehído 4% para fijar el cerebro y realizar cortes de la región del NAc de 30 $\mu$ m. Se evaluó por inmunofluorescencia la positividad para el marcador de microglía Iba1 y se realizaron análisis morfológicos utilizando el programa ImageJ. El análisis por inmunofluorescencia reveló que la descendencia programada con CAF mostraba una mayor positividad para el marcador de microglía Iba1 en la región del NAc, en comparación con los controles (Figura 10A). Además, identificamos que las células de microglía en el NAc de la descendencia programada con CAF exhiben 1.5 veces más ramificaciones por célula (endpoints) y procesos de ramificación 2.3 veces más largos (Branch length) en comparación con la microglía de la descendencia de CD (Figura 10 B, C, D). Esto sugiere que la programación con dieta CAF favorece el fenotipo de una microglía reactiva semejando una respuesta pro-inflamatoria exacerbada en el NAc de la descendencia.



**Figura 10. La programación nutricional materna induce cambios morfológicos en la microglía del NAc de descendencia F1.** A. Imágenes representativas del marcador inmunofluorescente Iba1 y morfología binaria de la microglía en el NAc de la descendencia programada con dieta CD y CAF. Complejidad de la microglía definida por los **B**. End points, **C**. Branch length y **D**. Dimensión fractal entre la descendencia programada dieta CD y CAF. Datos expresados como  $\pm$  SEM posterior a una prueba T-student para datos no pareados, considerando como significancia estadística una \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

**iii. La programación nutricional materna induce la sobreexpresión del gen *Ifit1* y citocinas pro-inflamatorias en el NAc de los machos F1 que muestran un comportamiento similar a la adicción a la comida.**

Para determinar el efecto de la programación nutricional materna en la inducción de neuroinflamación en la región del NAc de la descendencia, se seleccionaron 22 machos programados del grupo CD (A=13; NA=9) y 22 machos programados del grupo de CAF (A=13; NA=9), se aisló el RNA total de la región del NAc y se determinaron los niveles de expresión del gen *Ifit1* y las citocinas IL6 e IL1 $\beta$  por RTqPCR. Los resultados obtenidos, evidenciaron la sobreexpresión significativa del mRNA de los genes *Ifit1* e IL6, así como una subexpresión del gen de la IL1 $\beta$  en el NAc de machos programados con dieta CAF que mostraban un comportamiento similar a la adicción (A-CAF), en comparación con los CD (Figura 11A-C). Los resultados sugieren que la programación con dieta de CAF programa una respuesta inflamatoria en la región del NAc de la descendencia, lo cual se asocia al desarrollo del comportamiento adictivo. Esto concuerda con un reporte previo de nuestro grupo de investigación en donde se evidenció la sobreexpresión de la citosina pro-inflamatoria IL6 en el NAc de sujetos que mostraban un comportamiento similar al adictivo (Cruz-carrillo et al. 2020).

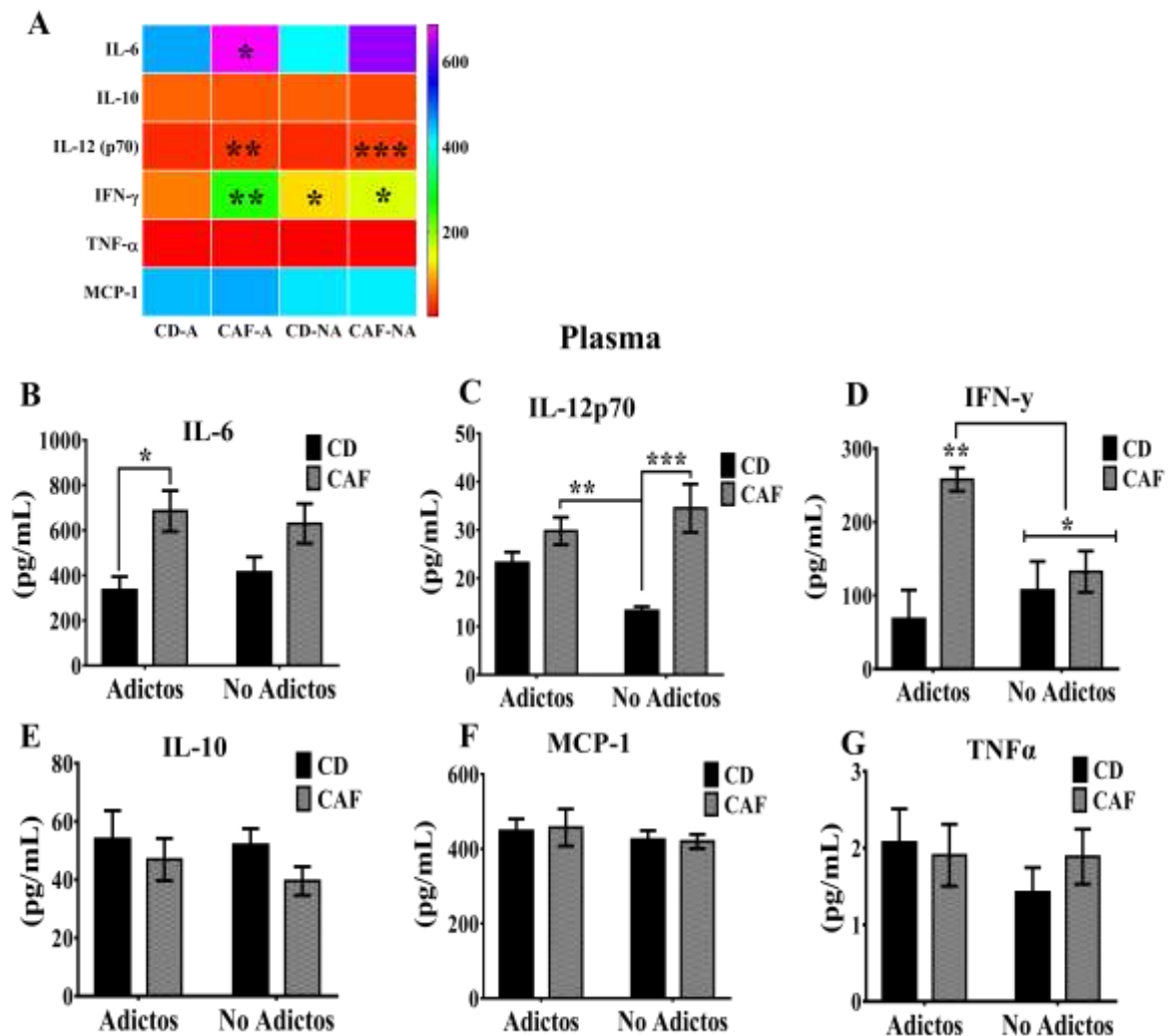


**Figura 11.** La programación nutricional materna induce la sobreexpresión de *Ifit1* y citocinas inflamatorias el NAc de la descendencia F1. Resultados de RTqPCR para la expresión del mRNA de: **A.** *Ifit1*, **B.** *IL6* e **C.** *IL1β* en el NAc de la descendencia CAF (n=22) y CD (n = 22). Los gráficos muestran datos normalizados de la media  $\pm$  SEM y una significación estadística obtenida mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc de Tukey. Para A-CAF vs NA-CD \*p <0.05, para A-CAF vs a NA-CAF <sup>a</sup>p <0.05 y para A-CAF vs A-CD <sup>b</sup>p <0.05, \*\*p<0.001, <sup>aa</sup>p<0.001, [A, tipo adicción; NA, no similar a una adicción].

#### **iv. La programación nutricional materna expuesta a dieta de cafetería induce inflamación periférica en la descendencia F1**

Antecedentes previos, ya han demostrado que la programación nutricional materna promueve inflamación periférica que favorece la activación central de la microglía y el desarrollo de conductas motivantes aberrantes en la descendencia (Maldonado-Ruiz et al. 2019; Montalvo-Martínez et al. 2018; Camacho et al. 2017). Por lo tanto, adicionalmente evaluamos el perfil inflamatorio en el plasma de la descendencia programada.

Los resultados demuestran que los sujetos F1 con un comportamiento similar a la adicción, presentaban niveles elevados en plasma de las citocinas IL6, IL12p70 e IFN $\gamma$  en comparación con los controles (Figura 12A, B-D). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de las citocinas IL10, MCP-1 y TNF $\alpha$  entre la descendencia programada con CAF y los descendientes del grupo CD (Figura 12E-G).

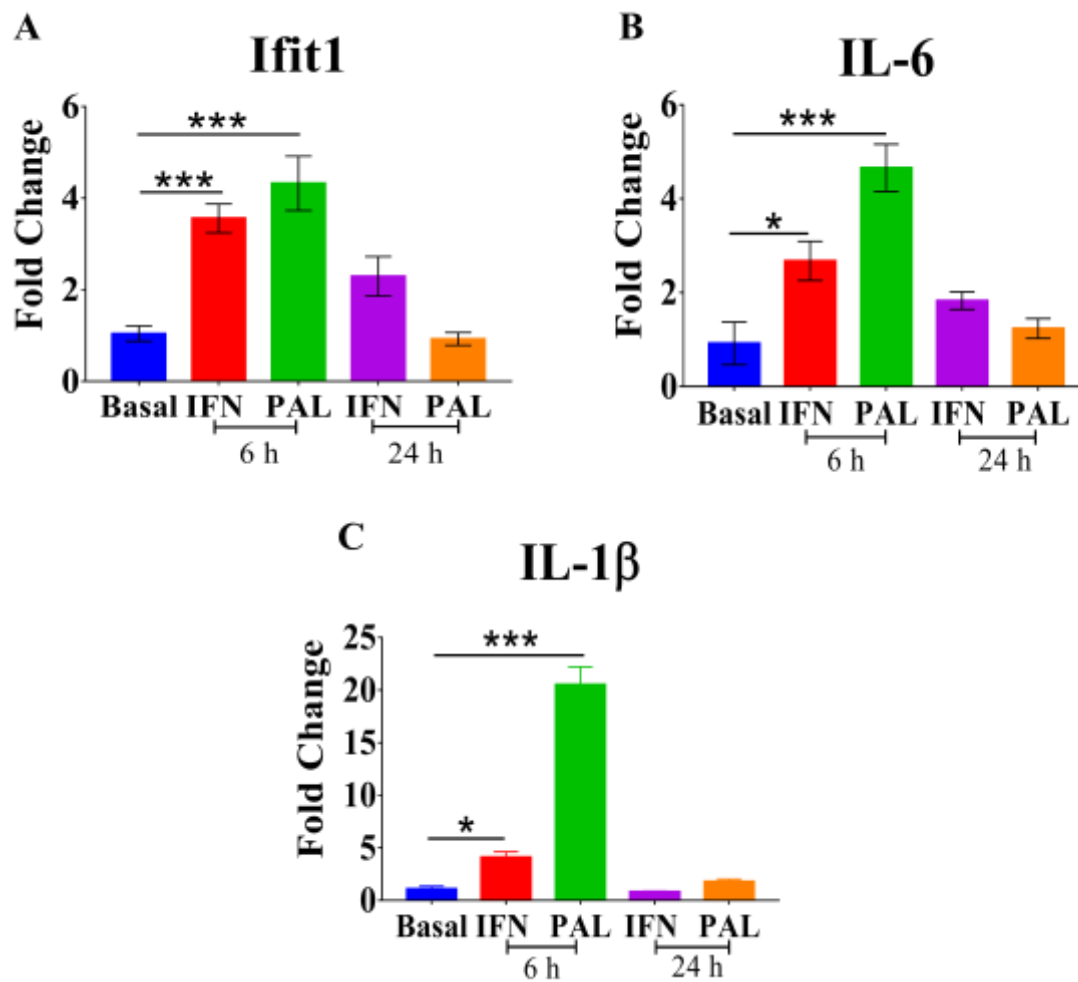


**Figura 12. La programación nutricional materna induce inflamación periférica en la descendencia F1.** Niveles plasmáticos de citocinas cuantificados por Bioplex de sujetos adictos y no adictos programados con dieta CAF (n=7) y CD (n=7). **A.** Heat map representativo de la comparación de niveles plasmáticos de las citocinas: IL6, IL12p70, IL10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y MCP-1 de los sujetos programados con CAF contra sujetos CD no adictos. **B-G.** Gráfica de barras para las diferencias en los niveles plasmáticos de las citocinas: IL6, IL12p70, IL10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y MCP-1, entre sujetos CAF y CD. Los datos se muestran como  $\pm$  SEM, con una significancia estadística de \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, después de usar ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

**v. El interferón alfa y el ácido palmítico inducen la activación de la vía de interferón de tipo I, que conlleva a la sobreexpresión de Ifit1 y citocinas pro-inflamatorias en la microglía**

De acuerdo a los resultados anteriores, la programación por dieta CAF induce la sobreexpresión de Ifit1 en el NAc de la descendencia con comportamiento similar a la adicción. Sin embargo, no conocemos si la activación de la vía del interferón de tipo I modula directamente la expresión de citocinas pro-inflamatorias. Para llevar a cabo dicha evaluación se empleó IFN $\alpha$  como uno de los inductores principales de la vía de interferón de tipo I y se determinaron los niveles de Ifit1 como producto de la activación de ésta vía, así como las citocinas pro-inflamatorias IL6 e IL1 $\beta$  por RTqPCR. Además, también quisimos evaluar el efecto de la dieta sobre la activación de la vía del interferón de tipo I y citocinas inflamatorias. Para esto, utilizamos PAL que representa el componente principal de las dietas hipercalóricas (ej. Dieta CAF). Se realizó una estimulación de una línea celular de microglía (SIM-A9) con IFN $\alpha$  (200ng) y PAL (100 $\mu$ M) por 6 o 24 horas y se determinaron los niveles de expresión de Ifit1, IL6 e IL1 $\beta$ . Los resultados demuestran que tanto el inductor primario de la vía de interferón tipo I (IFN $\alpha$ ) como el PAL, son capaces de inducir la sobreexpresión del gen Ifit1 y las citocinas IL6 e IL1 $\beta$  a las 6 horas post-estimulación en la microglía (Figura 13A-C). Estos resultados sugieren que la dieta de CAF es un inductor potente de la activación de la vía del interferón de tipo I y citocinas pro-inflamatorias en la microglía.





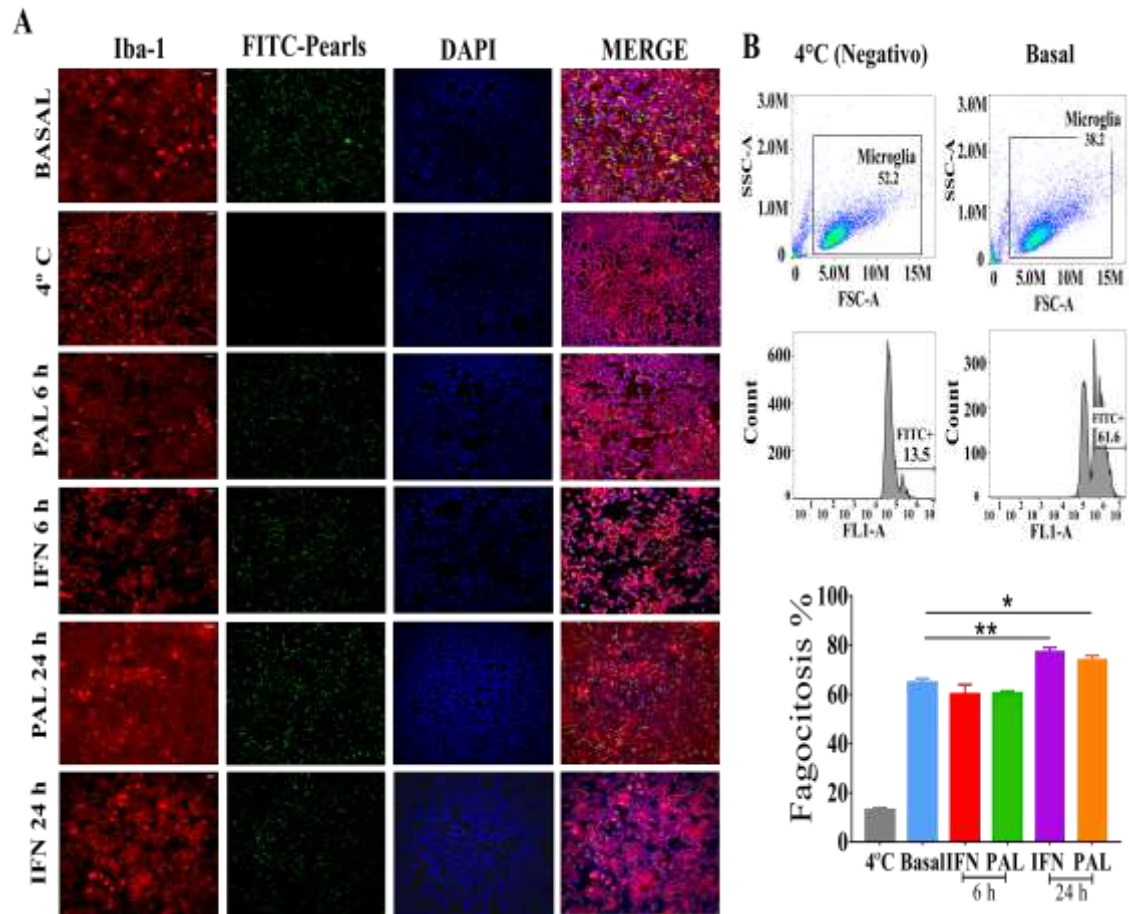
**Figura 13. La estimulación con IFN $\alpha$  y PAL inducen la sobreexpresión de Ifit1, IL6 e IL1 $\beta$  en cultivo de células de microglía.** Resultados de la expresión de mRNA por RTqPCR en células de microglía tratadas con IFN $\alpha$  (200 ng) o PAL (100  $\mu$ M). Los gráficos muestran la media de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. La significancia estadística se estableció después de usar ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **A.** Expresión relativa de Ifit1:  $F(4, 20) = 17.08$ ,  $***p < 0.0001$ , **B.** Expresión relativa de IL6:  $F(4, 17) = 19.95$ ,  $***p < 0.0001$ . **C.** Expresión relativa de IL1 $\beta$ :  $F(4, 21) = 144$ ,  $p < 0.0001$

## **vi. El interferón alfa y ácido palmítico afectan la capacidad fagocítica de la microglía *in vitro***

Adicional a la evaluación del efecto de la activación de la vía del interferón con IFN $\alpha$  y el PAL en la expresión de citocinas proinflamatorias, evaluamos su efecto en la función fagocítica de la microglía. Para llevar a cabo este objetivo, se estimularon células de microglía con IFN $\alpha$  o PAL como anteriormente se mencionó por 6 o 24 horas y se evaluó la fagocitosis de perlas de latex marcada con FITC. Los resultados revelan la función intrínseca de fagocitosis en la microglía que muestra la colocalización del marcador nuclear DAPI, el marcador de microglía Iba-1 y FITC acoplado a las perlas de latex. A 4°C la colocalización de dichos marcadores es casi nula, por lo que se utilizó como control negativo. La estimulación de la microglía con IFN $\alpha$  y PAL a las 6 horas no muestra colocalización de los marcadores de Iba-1, DAPI y FITC, por lo que demuestra ausencia de la función fagocítica de la microglía. Por otro lado, la microglía estimulada con IFN $\alpha$  y PAL por 24 horas, si muestra un aumento en la colocalización de los marcadores de núcleo celular, microglía y perlas-FITC, en ambos tratamientos; siendo evidente una mayor colocalización de estos marcadores en la microglía tratada con IFN $\alpha$  (Figura 14A).

Los resultados cuantitativos realizados mediante citometría de flujo, confirman lo observado por microscopia confocal. A 4°C las células de microglía presentan solo un 13% de función fagocítica, mientras que su nivel basal fue de un 65%. La estimulación con IFN $\alpha$  y PAL a las 6 horas no afectó significativamente el porcentaje de fagocitosis en comparación con los niveles basales (Basal: 65%, IFN $\alpha$ : 58%, PAL: 60%). Sin embargo, la estimulación por 24 horas, aumento el porcentaje de fagocitosis en un 12% y un 9%, para IFN $\alpha$  y PAL, respectivamente, respecto al basal (Figura 14B).

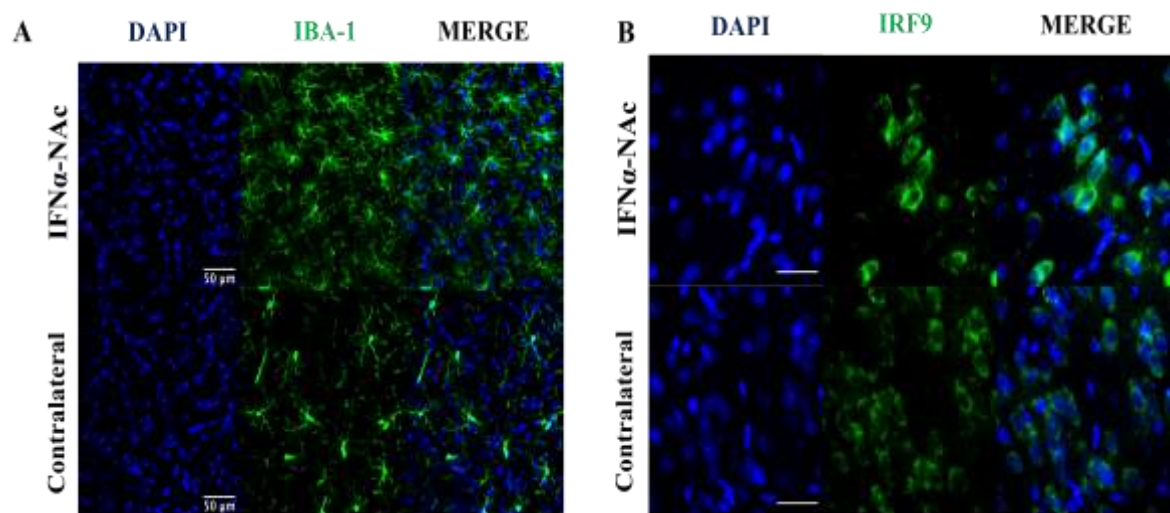
En conjunto, los resultados anteriores, sugieren que los componentes de la dieta CAF como el PAL durante el embarazo, al igual que el IFN $\alpha$  pueden modular una activación transcripcional temprana de Ifit1 y genes proinflamatorios, seguido de la actividad fagocítica en las células de la microglía.



**Figura 14. La estimulación con IFN $\alpha$  y PAL incrementan la capacidad fagocítica de la microglía *in vitro*.** **A.** Análisis de citometría de flujo que muestra el efecto del tratamiento con IFN $\alpha$  (200 ng) y PAL (100  $\mu$ M) sobre la función fagocítica microglía (intensidad de fluorescencia media; MFI). Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM de los datos normalizados en relación con el % de fagocitosis de células de microglía de un experimento independiente; de un total de cuatro. **B.** La significancia estadística se estableció después de usar ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para IFN $\alpha$  y PAL 6 h / 24 h:  $F(5, 48) = 111,9$ ,  $p < 0,0001$ . Significancia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ .

## vii. El IFN $\alpha$ modula la activación de la microglía y la vía del interferón tipo I *in vivo*

Con el fin de determinar si el IFN $\alpha$  reproduce la activación de la microglía en un modelo *in vivo*, se evaluó por inmunotinción la activación de la microglía empleando el marcador Iba1 y la activación de la vía de interferón tipo I empleando el marcador IRF9. El IRF9 es un intermediario río abajo de la activación del receptor de interferón IFNAR que se trasloca al núcleo e induce la expresión de citocinas proinflamatorias. Para este objetivo, administramos estereotáxicamente IFN $\alpha$  (2000U) en la región del NAc de ratas control. Los resultados exhiben una mayor inmunotinción para los marcadores Iba-1 e IRF9 en el NAc de los sujetos después de la administración de IFN $\alpha$  en comparación con la región contralateral del NAc (no administrada) (Figura 15A, B). Estos resultados confirman parcialmente que el IFN $\alpha$  podría modular la activación de la vía de Ifit1 en las células de la microglía del NAc, lo que podría inducir una mayor actividad fagocítica y expresión de citocinas proinflamatorias.

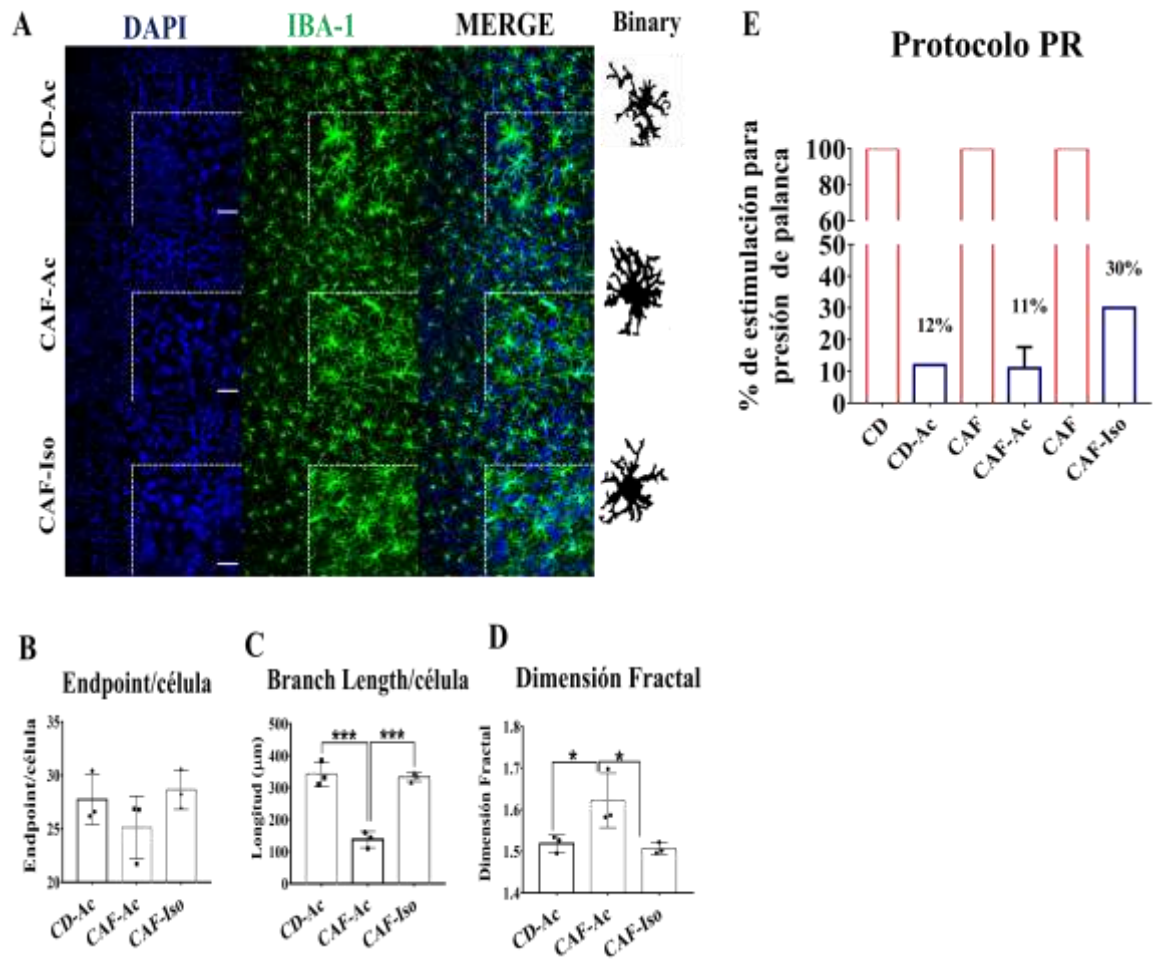


**Figura 15. La estimulación *in vivo* con IFN $\alpha$  inducen activación de la microglía y la vía del interferón tipo I en el NAc Shell.**

A. Análisis de Inmunofluorescencia para los marcadores Iba1 e IRF9 en la región del NAc y área contralateral no administrada (control).

**viii. El bloqueo de la vía de señalización del interferón tipo I mediante el anticuerpo neutralizante anti-IFNAR, disminuye la motivación de la descendencia con un comportamiento similar al adictivo in vivo**

Una vez comprobada la activación *in vivo* de la vía del interferón tipo I, decidimos utilizar un anticuerpo neutralizante del receptor de interferón tipo I para bloquear la señalización río abajo del interferón con el fin de determinar si el bloqueo de esta vía, disminuye el comportamiento similar al adictivo de la descendencia F1 de madres programadas con dieta cafetería. Principalmente, similar a lo ya observado, la programación con dieta de CAF promueve mayor expresión del marcador Iba1 en la región del NAc en comparación con los sujetos CD (Figura 16A). Por otro lado, observamos que la administración del anti-IFNAR en la región del NAc, promueve cambios morfológicos en la microglía como son una tendencia a presentar menos ramificaciones (endpoints), una disminución de la longitud de las ramificaciones, así como un aumento en su complejidad (dimensión fractal), en comparación con el grupo CD-Ac y el grupo de CAF-Iso (Figura 16B, C, D). Finalmente, pudimos observar que, el bloqueo de la vía del interferón tipo I con el anti-IFNAR en el NAc, disminuye un 88% la motivación de sujetos control y un 89% la motivación de sujetos del grupo CAF con un comportamiento similar a la adicción, mientras que la administración del anticuerpo Isotipo solo tuvo un efecto del 70% en la reducción de la motivación en sujetos del grupo CAF (Figura 16E). Estos resultados confirman parcialmente que el bloqueo de la vía del interferón tipo I puede modular activación y reactividad de las células de la microglía del NAc, así como el comportamiento similar a la adicción.



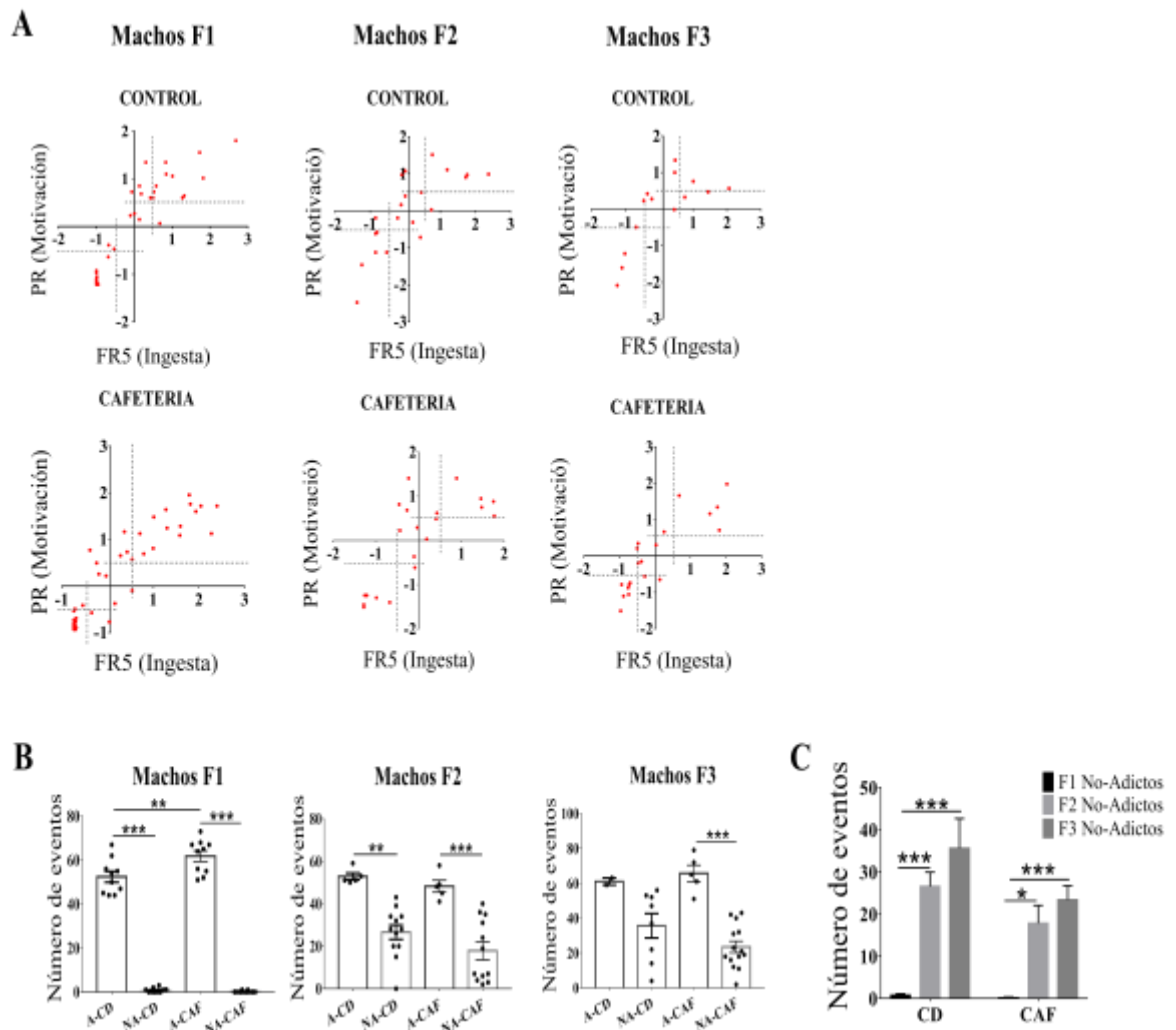
**Figura 16. El bloqueo in vivo de la vía del interferón tipo I modula la motivación de sujetos con un comportamiento similar a la adicción.**

A. Análisis de Inmunofluorescencia para el marcador Iba1 en la región del NAc de sujetos con los distintos tratamientos. Gráficas de barras de los análisis morfológicos de la microglía B. Número de ramificaciones o Endpoints, C. Longitud de las ramificaciones o Branch Length, D. Complejidad de las células de microglía o Dimensión fractal. E. Gráfica de porcentajes para la disminución de la motivación, representada en porcentaje de estimulación de la palanca en la caja Skinner. Datos mostrados como  $\pm$  SEM, posterior a un ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey y considerando una  $p < 0.05$ .

**ix. La exposición a dieta de cafetería durante el embarazo y la lactancia programan la herencia intergeneracional del comportamiento similar a la adicción a la comida**

De acuerdo a los resultados anteriores, la sobreexpresión de *Ifit1* y citocinas pro-inflamatorias en el NAc shell de la descendencia dada por programación con dieta de CAF, se asocia al desarrollo del comportamiento similar a la adicción en la generación F1. Sin embargo, se desconoce el impacto de la programación con dieta CAF en generaciones posteriores como la F2 y F3. Evaluamos el efecto de la dieta de cafetería en el desarrollo y herencia transgeneracional del fenotipo adictivo de las generaciones F2 y F3.

Similar a lo observado en la generación de descendientes F1, ambas generaciones de machos F2 y F3, evidencian la presencia de sujetos con alta (adictos: cuadrante superior derecho) y con baja (no adictos: cuadrante inferior izquierdo) respuesta a la estimulación de la palanca durante los protocolos FR5/PR (Figura 17A). Sin embargo, a diferencia de la F1, no se encontró diferencia en la motivación (número de eventos) de la descendencia F2 y F3 durante el protocolo PR entre CD y CAF (Figura 17B). Interesantemente, los sujetos clasificados como no adictos (NA) tanto del grupo CD como de CAF, de ambas generaciones F2 y F3, presentan mayor motivación, en comparación con los sujetos no adictos de la generación F1 (Figura 17C). Finalmente, cabe mencionar que, la programación fetal por exposición a la dieta CAF preserva una mayor motivación en la respuesta a la presión de la palanca para recompensas calóricas durante PR, a lo largo de las tres generaciones: F1, F2 y F3, en comparación con los sujetos CD (Figura 17B). Estos resultados, demuestran que el consumo de una dieta de CAF durante el embarazo y la lactancia es capaz de programar a la descendencia a presentar comportamientos similares a la adicción hasta una tercera generación.



**Figura 17. Herencia transgeneracional del comportamiento adictivo.**

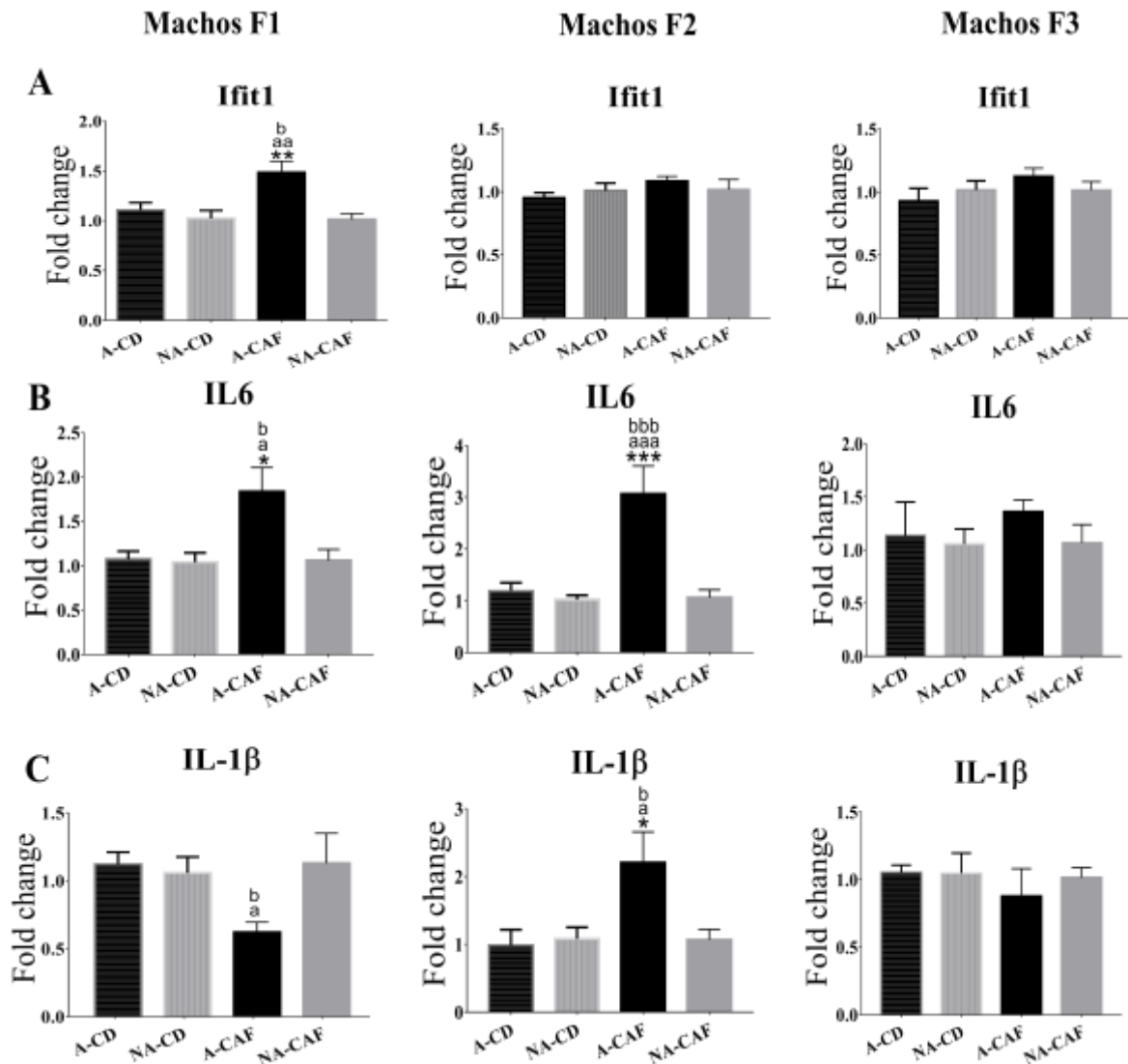
**A.** Datos de puntajes de motivación (basados en PR) o ingesta (basados en FR5) en la descendencia programada por las dietas CD y CAF estableciendo una puntuación de corte en los ejes "x" e "y" de +0.5 o -0.5; referencia para clasificación en adictos o no adictos respectivamente. Comida: F1 n = 36, F2 n = 22, F3 n = 14; Cafetería: F1 n = 36, F2 n = 21, F3 n = 20. **B.** Análisis estadístico de la diferencia en el comportamiento motivacional durante el protocolo PR entre grupos (CD vs CAF) a través de las generaciones F1, F2 y F3. **C.** Análisis estadístico de la diferencia entre sujetos no adictos de las tres generaciones. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, después de un ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey. Para F1:  $F(3, 36) = 355,9$ ,  $p < 0,0001$ . Para F2:  $F(3, 30) = 15,13$ ,  $p < 0,0001$ . Para F3:  $F(3, 25) = 12,43$ ,  $p < 0,0001$ . [A, tipo adicción; NA, no similar a una adicción]. Significancia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .



**x. La exposición a dieta de CAF durante el embarazo y la lactancia programan la herencia intergeneracional de la sobreexpresión de IL6 en sujetos con un comportamiento similar a la adicción a la comida.**

Ahora bien, una vez evaluado el alcance de la programación con dieta de CAF en el comportamiento similar a la adicción a través de las generaciones, en esta fase evaluamos el efecto de la programación en la expresión de *Ifit1* y las citocinas IL6 e IL1 $\beta$  en el NAc de la descendencia F2 y F3. Para este objetivo, se seleccionaron machos adictos y no adictos de ambos grupos experimentales CD y CAF, de cada generación F2 y F3. Se aisló el RNA total de la región del NAc de cada sujeto y se evaluó la expresión de los genes *Ifit1*, IL6 e IL1 $\beta$  mediante RTqPCR. A diferencia de lo observado en los descendientes F1, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *Ifit1* en el NAc de machos adictos y no adictos (A vs NA) de ambos grupos CD y CAF; de las generaciones F2 y F3 (Figura 18A). En el caso de la citosina IL6, solo los sujetos de la generación F2 con un comportamiento similar a la adicción, mostraron incremento en su expresión en la región del NAc shell (Figura 18B). De igual manera, la citosina IL1 $\beta$  se encontró sobreexpresada en la región del NAc shell de la descendencia F2 programada con CAF que mostraba un comportamiento similar al adictivo, no así en la descendencia F3 (Figura 18C).

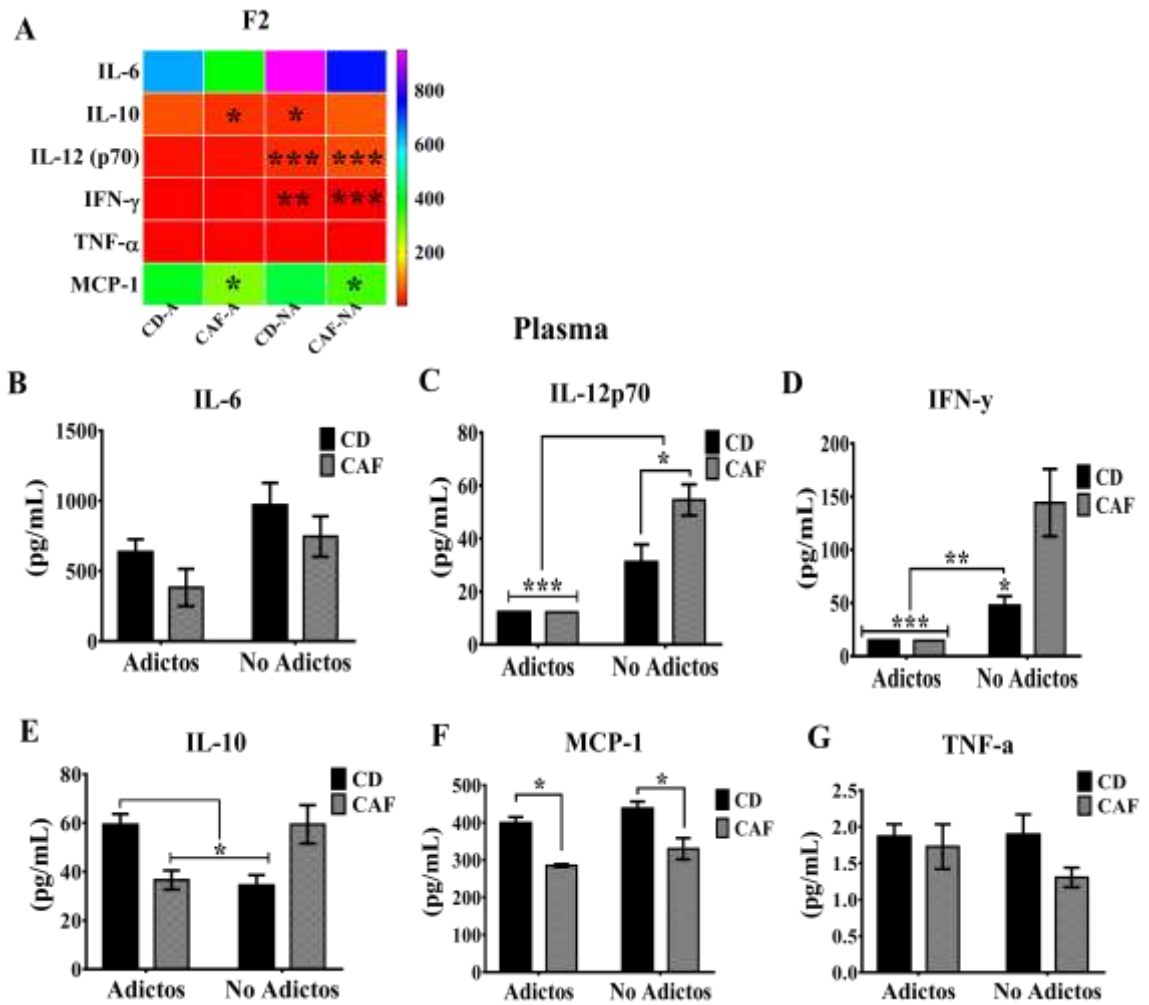
Estos resultados, sugieren la participación de las citocinas pro-inflamatorias IL6 e IL1 $\beta$  en el desarrollo del comportamiento adictivo, así como la existencia de una programación de la sobreexpresión de la IL6 en el NAc que se hereda y favorece la preservación del comportamiento adictivo hasta la generación F2.



**Figura 18.** La exposición a una dieta hipercalórica durante el embarazo y la lactancia programa la expresión de *Ifit1* y citocinas pro-inflamatorias en sujetos con un comportamiento similar al adictivo hasta por 2 generaciones. Resultados de la expresión por RTqPCR para el mRNA de **A.** *Ifit1*, **B.** *IL6* e **C.** *IL1 $\beta$*  en el NAc de la descendencia F1, F2 y F3. Los resultados se expresan como la media + SEM, posterior a un ANOVA de una vía; post hoc de Tukey. Nota: (\*) A-CAF vs NA-CD; (a) A-CAF vs NA-CAF; (b) A-CAF vs A-CD. Significancia: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , ap $< 0.05$ , aap $< 0.001$ , bp $< 0.05$ , bbbp $< 0.0001$ . [A, tipo adicción; NA, no similar a una adicción].

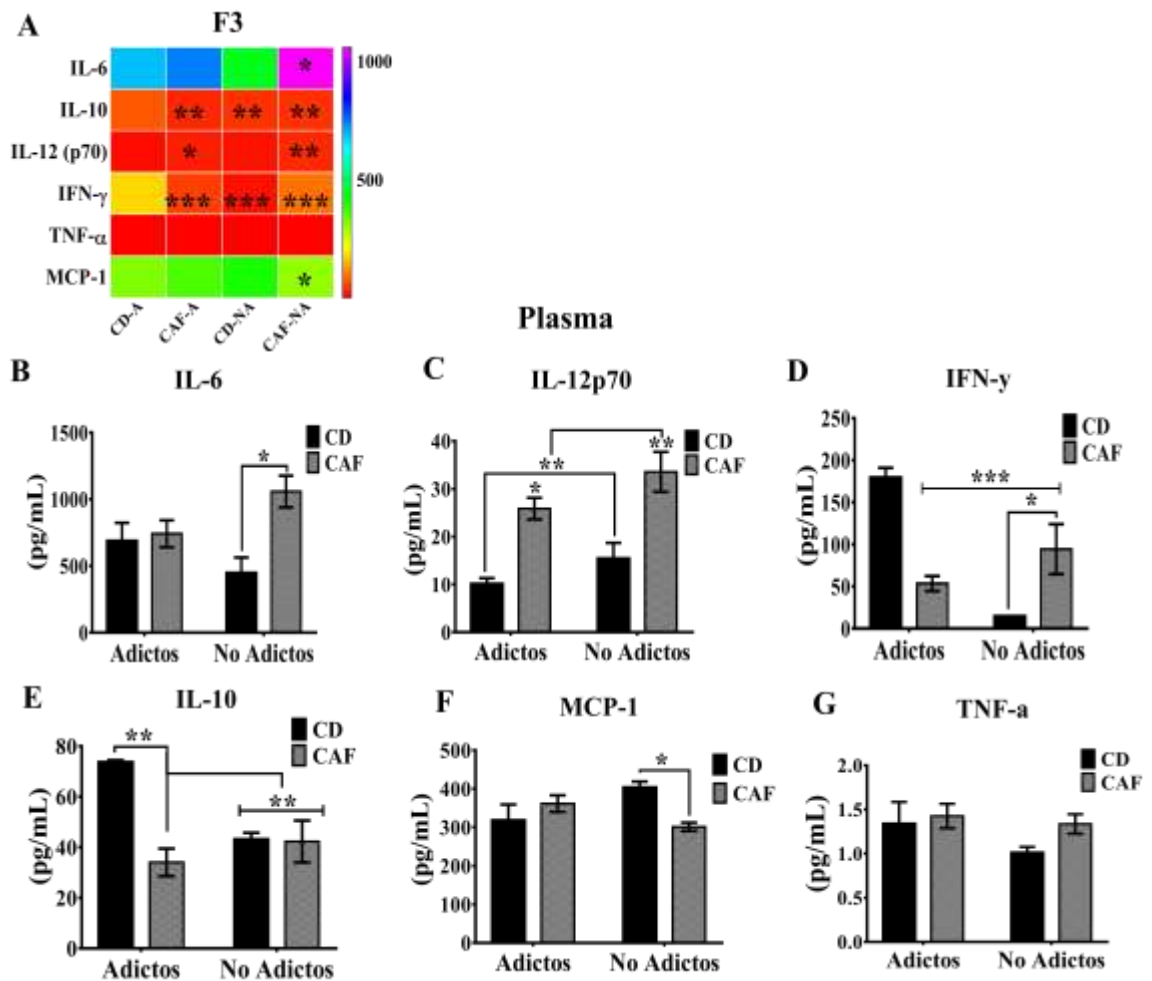
**xi. La exposición a dieta de CAF durante el embarazo y la lactancia programan inflamación periférica en la descendencia que perdura hasta la tercera generación (F3)**

Finalmente, evaluamos el efecto de la programación nutricional materna en el perfil inflamatorio en el plasma de la descendencia F2 y F3. Los resultados indican que la descendencia F2 programada con CAF y con un comportamiento similar a la adicción, presentaba disminución en los niveles plasmáticos de las citocinas IL12p70, IL10, IFN $\gamma$  y MCP-1 en comparación con los CD (Figura 19C-F). No se encontraron diferencias significativas entre grupos CAF y CD, en los niveles de IL6 y TNF $\alpha$  (Figura 19B, G). Por otro lado, la descendencia F3 programada con CAF presentaba niveles disminuidos de las citocinas IL10 e IFN $\gamma$  (Figura 20 D, E) y un aumento de las citocinas IL12p70 e IL6 en plasma (Figura 20 A-C), respecto a los controles. No se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  y MCP-1 entre grupos (CD y CAF) (Figura 20 F, G).



**Figura 19. La programación nutricional materna programa una inflamación periférica que perdura hasta la segunda generación (F2).**

A. Mapa de calor que integra las diferencias en las concentraciones plasmáticas de citocinas de sujetos programados con dieta CAF y CD contra sujetos control no adictos (CD-NA), **B-G**. Gráfico de barras para las diferencias plasmáticas de citocinas entre sujetos adictos y no adictos de los grupos CAF y CD. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y significancia estadística después de usar ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey y considerando como significancia a \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p > 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . Para estos análisis utilizamos grupos de: F2 CD n = 12, CAF n = 10.

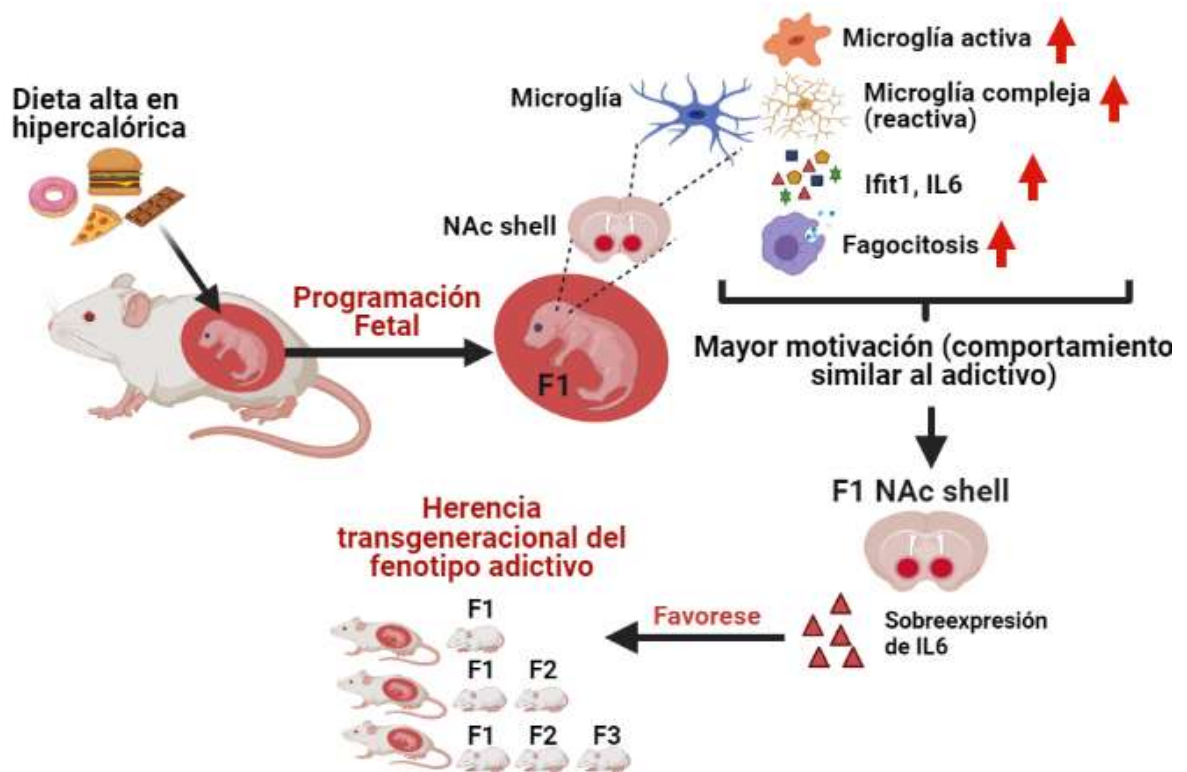


**Figura 20. La programación nutricional materna programa inflamación periférica que perdura hasta la tercera generación (F3).**

A. Mapa de calor que integra las diferencias en las concentraciones plasmáticas de citocinas de sujetos programados con dieta CAF y CD contra sujetos control no adictos (CD-NA), **B-G**. Gráfico de barras para las diferencias plasmáticas de citocinas entre sujetos adictos y no adictos de los grupos CAF y CD. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y significancia estadística después de usar ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey y considerando como significancia a \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p > 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . Para estos análisis utilizamos grupos de: F3 CD  $n=7-10$ , CAF  $n=7-12$ .

## VIII. DISCUSIÓN

En este proyecto se demostró que la programación fetal por dietas hipercalóricas (CAF) promueve la herencia intergeneracional del comportamiento similar a la adicción hacia reforzadores calóricos, evidenciado por las altas respuestas en la presión de palanca durante el protocolo de condicionamiento operante observado en la descendencia F1, F2 y F3. Además, identificamos que la dieta CAF altera la expresión de genes inflamatorios en el NAc shell de la descendencia F1 que correlaciona al desarrollo y herencia del fenotipo adictivo. En particular, demostramos que la exposición fetal a la dieta CAF programa la sobreexpresión del gen *Ifit1* y de citocinas pro-inflamatorias en el NAc shell de sujetos con un diagnóstico de comportamiento similar a la adicción a la comida. También, se evidenció que la descendencia programada con dieta de CAF, muestra mayor positividad para el marcador de microglía *Iba1*, así como una mayor complejidad de las células de la microglía (característica de un estado reactivo), en la región del NAc shell en comparación con los CD. Adicionalmente, demostramos que la programación nutricional materna, promueve un estado de inflamación periférica en la descendencia. Finalmente, demostramos que la programación por exposición a la dieta CAF conduce a una herencia intergeneracional de la respuesta inmune en el NAc, mediada por la sobreexpresión de *IL-6* en los sujetos adictos hasta la segunda generación F2, además de programar un estado de inflamación periférica que persiste hasta una tercera generación. Por lo anterior, nuestros datos apoyan la hipótesis novedosa que sugiere que la programación materna mediante dietas hipercalóricas programan la señalización de *Ifit1* en el NAc de la descendencia, favoreciendo un perfil proinflamatorio y la activación de la microglía que correlaciona con un comportamiento de adicción hacia reforzadores naturales (comida).



La programación nutricional materna de aspectos que favorecen o perjudican la salud de la descendencia ha sido descrita desde 1998 por Barker (Barker 1998; Szyf 2015). Nosotros y otros grupos de investigación en el mundo hemos reportado que la exposición a dietas hipercalóricas durante el desarrollo embrionario contribuye al desarrollo de defectos metabólicos, hormonales, alteraciones en la respuesta inmune, así como alteraciones del comportamiento que incluyen el desarrollo de adicción en la descendencia (Cardenas-Perez et al. 2018; Cruz-carrillo et al. 2020; Camacho et al. 2017; Naef et al. 2011; Z Y Ong and Muhlhausler 2011; Peleg-Raibstein et al. 2016). De importancia, existe un solo reporte que ha demostrado que el fenotipo similar a la adicción se conserva transgeneracionalmente hasta la generación F3 (Sarker et al. 2018). En nuestro estudio, principalmente confirmamos los reportes previos que apoyan el efecto perjudicial de la programación materna por dietas hipercalóricas en la susceptibilidad a presentar conductas motivantes a la comida en la

descendencia F1 (Camacho et al. 2017; Naef et al. 2011; Z Y Ong and Muhlhausler 2011; Peleg-Raibstein et al. 2016; Sarker and Peleg-Raibstein 2019; Cruz-carrillo et al. 2020). Nosotros, identificamos dos tipos de sujetos fenotípicamente distintos, los que muestran una motivación baja y los que muestran una alta motivación para recompensas calóricas durante el programa de condicionamiento operante, similar a lo que se observa con sujetos en la respuesta a la cocaína (Yamamoto et al. 2013; Le et al. 2017). Esto sugiere que la susceptibilidad de los individuos a presentar adicción, podría ser programada en las primeras etapas del desarrollo embrionario por factores genéticos, epigenéticos y ambientales (Pierce et al. 2018).

En este estudio, reportamos por primera vez que la exposición a dieta CAF durante el embarazo y la lactancia promueve la sobreexpresión de *Ifit1* en el NAc de machos F1 diagnosticados con un comportamiento similar a la adicción. Los genes de la familia IFIT son sensibles a la estimulación de IFN- $\alpha$  /  $\beta$ , así como a las vías de señalización de los TLR en respuesta a patógenos que incluyen bacterias, hongos y lípidos saturados (Milanski et al. 2009, 2012; Diamond and Farzan 2013; Zhou et al. 2013; Nallar and Kalvakolanu 2014; Valdearcos et al. 2014, 2017; de Git and Adan 2015; Tse et al. 2015).

En reportes previos se demuestra que la sobreexpresión de *Ifit1* y genes involucrados en la activación de la vía del interferón tipo I como: STAT1, STAT2, OAS1, los cuales ha sido identificados por microarreglos de expresión, en células progenitoras neuronales posterior a 24 horas de tratamiento con cocaína (Crawford et al. 2006). Además, un informe reciente en donde se empleó un modelo murino de activación inmune materna (MIA) mediante la inoculación de un desencadenante viral sintético (poli I: C), se identificó la sobreexpresión de *Ifit1* y la activación de genes relacionados con la vía de interferón tipo I (*ifn $\beta$* , *irf7*, *irf9*, *irf3* e *ifitm3*), en el saco vitelino embrionario en el día embrionario 14.5



(Ben-Yehuda et al. 2020) y que se asocia con una menor proliferación de microglía y un comportamiento defectuoso en la descendencia (Ben-Yehuda et al. 2020). Los interferones tipo I modulan la microglía en la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (Bialas et al. 2017), en el envejecimiento (Deczkowska et al. 2017), y se encuentran elevadas crónicamente en la edad adulta (Goldmann et al. 2015). En condiciones fisiológicas los interferones de tipo I en el SNC parecen estar involucrados en la supervivencia neuronal, la plasticidad neuronal, la estructura de la espina dendrítica, el crecimiento y la ramificación de neuritas (Ejlervskov et al. 2015; Hosseini et al. 2020), pero en niveles elevados, el IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  pueden conducir a un estado reactivo de la microglía y una elevada actividad fagocítica de material sináptico (Bialas et al. 2017; Roy et al. 2020) promoviendo el desarrollo de trastornos del comportamiento como depresión (Mostafavi et al. 2014; Su et al. 2019), neurodegeneración y Alzheimer (Mesquita et al. 2015; Taylor et al. 2018).

De manera integrativa, la dieta CAF rica en lípidos saturados puede programar a la microglía durante la gestación adoptando un fenotipo complejo que incluye cambios en la dimensión fractal, branch length y end points por célula en la descendencia diagnosticada con un comportamiento similar a la adicción a la comida.

Los cambios morfológicos de la microglía son resultado de la integración de señales externas e internas. La morfología hiperramificada de la microglía se puede considerar como un estado intermedio que exhibe una respuesta leve capaz de volver al fenotipo de reposo (Ziebell et al. 2017; Martianova et al. 2019). Sin embargo, la microglía hiperramificada también se ha identificado en el trastorno de estrés postraumático (K. L. Smith et al. 2019), estrés crónico por restricción (Hinwood et al. 2012), modelos de desesperación crónica (Hellwig et al. 2016), esquizofrenia, Alzheimer y trastorno afectivo (Karperien, Jelinek, and Buchan 2008), trastornos asociados a la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias (J. A.

Smith et al. 2012; Colonna and Butovsky 2017). Nuestros datos confirmaron la presencia de una microglía hiperramificada que exhibe un cuerpo celular agrandado con un aumento de los procesos de ramificación de naturaleza más gruesa en la descendencia programada con CAF. Esto sugiere que la programación nutricional materna altera la capacidad de recuperación fisiológica de la microglía activada (ameboide) al estado de reposo (ramificada) favoreciendo un fenotipo reactivo que permite que las células de la microglía permanezcan morfológicamente comparables al estado de reposo, pero pueden ser deficientes en las funciones homeostáticas y de vigilancia contribuyendo a la inflamación crónica y los efectos neurodegenerativos (Koss et al. 2019).

Para caracterizar el efecto de la señalización de la vía del interferón tipo I (IFNAR-Ifit1) sobre el perfil proinflamatorio y la activación de la microglía, realizamos ensayos in vitro utilizando células de microglía SIM-A9. Determinamos que la exposición de células de microglía a IFN $\alpha$  o PAL, el principal ácido graso saturado que se encuentra en la dieta CAF, promueven la sobreexpresión temprana de las citocinas Ifit1, IL6 e IL1 $\beta$  seguida de una respuesta fagocítica tardía. La activación del receptor de interferones tipo I (IFNAR) por IFN- $\alpha$  /  $\beta$  se ha reportado, puede conducir hacia una microglía reactiva y a la fagocitosis de sinapsis (Bialas et al. 2017; Aw, Zhang, and Carroll 2020) contribuyendo al desarrollo de déficit de aprendizaje espacial y de memoria (Baruch et al. 2014) y Alzheimer (Roy et al. 2020).

El ácido palmítico es uno de los principales ácidos grasos libres que promueve inflamación metabólica, y se ha reportado que sus niveles se incrementan significativamente en el cerebro y plasma después de la ingesta de una dieta alta en grasas. Interesantemente, el ácido palmítico, activa a las células de microglía a través de los receptores tipo toll 4 (TLR4), desencadenando una potente cascada inflamatoria que involucran la producción de IL6, IL1 $\beta$

e interferones de tipo uno (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ), siendo estos últimos los principales activadores del receptor IFNAR que desemboca en la producción de Ifit1 (Yanguas-Casás et al. 2018). Nuestro grupo de investigación previamente ha confirmado que la administración *in vitro* de PAL también aumenta la función fagocítica de la microglía (Tracy et al. 2013; Cruz-carrillo et al. 2020) y promueve la liberación de citocinas proinflamatorias (Maldonado-Ruiz et al. 2019; Cruz-carrillo et al. 2020). En este trabajo confirmamos que la administración central de IFN $\alpha$  en el NAc shell activa la vía de señalización de IFNAR-IRF9-Ifit1, lo cual correlacionó con cambios en la plasticidad morfológica y activación de la microglía. Estos resultados concuerdan con reportes previos demostrando que la administración intracerebral de PAL y la programación materna por exposición a una dieta CAF favorecen la activación de la microglía en el hipotálamo y el NAc (Maldonado-Ruiz et al. 2019; Cruz-carrillo et al. 2020).

Una segunda contribución importante de nuestro estudio es que la programación materna con dieta CAF promueve la herencia intergeneracional del comportamiento similar a la adicción, lo cual correlaciona con la sobreexpresión de IL-6 en el NAc shell de los sujetos hasta la segunda generación F2. La herencia intergeneracional del comportamiento similar a la adicción a la comida de la descendencia F1 hacia la F3 de madres alimentadas con una dieta hipercalórica durante la gestación ha sido reportada previamente (Sarker et al. 2018; Sarker and Peleg-Raibstein 2019). Además, existen evidencia que demuestran que la exposición a dietas hipercalóricas durante el desarrollo embrionario contribuye a respuestas metabólicas, hormonales e inmunes deficientes, y al desarrollo de comportamientos similares a la adicción en la descendencia (Peleg-Raibstein et al. 2016; Cardenas-Perez et al. 2018; Montalvo-Martínez et al. 2018; Cruz-carrillo et al. 2020).

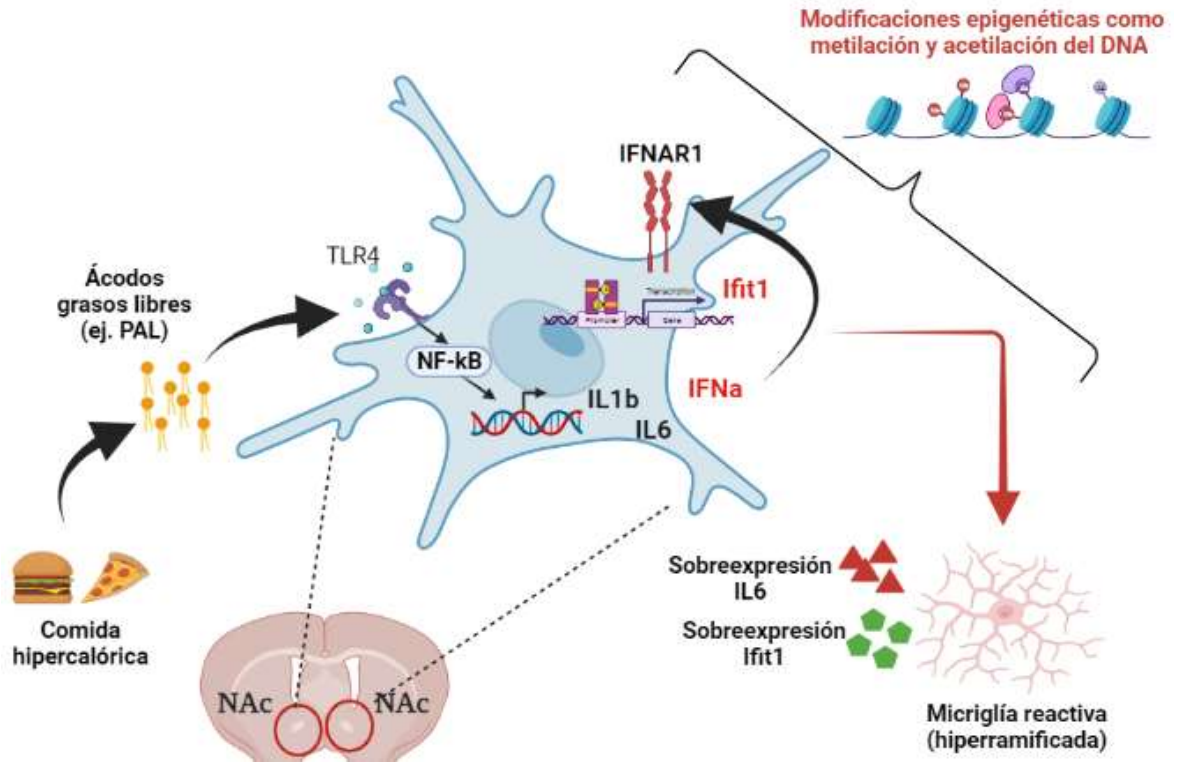
Niveles elevados de IL-6 e IFN $\alpha$  /  $\beta$  se han encontrado en pacientes con trastornos cerebrales que incluyen al Parkinson (West et al. 2019), neurodegeneración relacionada con el lupus (Bialas et al. 2017), deterioro cognitivo relacionado con la edad (Baruch et al. 2014) y Alzheimer (Roy et al. 2020). En nuestro trabajo, nosotros hemos reportado que la sobreexpresión de IL6 e Ifit1 en la región del NAc shell se asocia al desarrollo de un comportamiento similar a la adicción en la descendencia F1 de hembras alimentadas con dieta de CAF (Cruz-carrillo et al. 2020), cambios que se preservan hasta la segunda generación F2. A la fecha, no existen reportes que demuestren la sobreexpresión de citocinas en generaciones posteriores y su relación con la herencia del fenotipo adictivo. Sin embargo, algunos estudios han comenzado a decodificar los rasgos epigenéticos y genéticos que ayudan en la herencia transgeneracional de la adicción impulsada por la dieta (Naef et al. 2011; Vassoler and Sadri-Vakili 2014; Camacho et al. 2017; Sarker et al. 2018; Cruz-carrillo et al. 2020). Un reporte reciente confirmó que las fórmulas de alimentos hipercalóricos promueven una reprogramación epigenética de las células progenitoras mieloides, lo que permite una mayor proliferación y una mejor respuesta inmune innata (Christ et al. 2018), que los autores denominaron inmunidad entrenada o “trained immunity”, y que podría estar presente por largos períodos de tiempo (Netea, Quintin, and Van Der Meer 2011; Samir, Malireddi, and Kanneganti 2018).

Las rutas moleculares de regulación epigenética en el cerebro posteriores a la exposición de dieta calórica no han sido totalmente esclarecidas. En particular, la ingesta de una dieta mediterránea durante 5 años aumenta significativamente la metilación del DNA y disminuye los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$ , sICAM-1 y CRP (Arpon et al. 2016). La metilación del DNA es un coordinador profundo de la programación fetal, que provoca cambios duraderos en la plasticidad cerebral relacionados con la motivación (LaPlant et al.

2010; Nestler 2014) y la herencia transgeneracional del fenotipo adictivo (Robison and Nestler 2011; Szyf 2015). Nosotros hemos reportado que la exposición materna a la dieta CAF aumenta la metilación global del DNA en la región del NAc, lo que correlaciona con la sobreexpresión de IL6 y un comportamiento similar a la adicción a la comida en la descendencia (Cruz-carrillo et al. 2020). En cualquier caso, el mecanismo epigenético que establece la herencia intergeneracional de IL-6 en el NAc de los sujetos diagnosticados con un comportamiento similar a la adicción sigue sin estar claro. Las células inmunes integran secuencias promotoras y potenciadoras para ser moduladas por marcas epigenéticas (Jasiulionis 2018), por ejemplo, H3K9me2 y H3K9me3 establecen una inducibilidad celular específica de interferones de tipo I e ISG en macrófagos inmaduros (Zhang and Cao 2019) y la lisina desmetilasa 6A (KDM6A) promueve la transcripción de IL-6 al desmetilar el H3K27me3 (Li et al. 2017). Además, los cambios metabólicos en los monocitos activados por el  $\beta$ -glucano de *Cándida* aumentan la trimetilación de H3K4 y la acetilación de H3K27, lo que conduce a una mayor producción de las citocinas IL-6 y TNF, inflamación e "inmunidad entrenada" (Kleinnijenhuis et al. 2012; Jasiulionis 2018). Esta evidencia respalda que las fórmulas de alimentos hipercalóricos podrían establecer firmas de metilación en la descendencia y contribuir a la herencia intergeneracional de perfiles proinflamatorios.

En conjunto, nuestro trabajo reafirma la propuesta de que la programación materna mediante alimentos de alto contenido energético programan la activación de la vía de señalización IFNAR-Ifit1 y favorecen el comportamiento de motivación hacia recompensas hipercalóricas en la descendencia (Claycombe, Brissette, and Ghribi 2015; Edlow 2017), lo cual replica el mayor valor hedónico de los alimentos en sujetos clasificados como adictos a la comida (Loxton and Tipman 2017; Ruddock, Field, and Hardman 2017).

Finalmente, nosotros proponemos que la señalización del interferón tipo I y la IL6 en el NAc shell aumentan la susceptibilidad a desarrollar un comportamiento similar a la adicción a la comida y favorece su herencia en la descendencia.



## **IX. CONCLUSIÓN**

La activación de la vía del interferón tipo I y la sobreexpresión de IL6 en el NAc shell de la descendencia de madres expuestas a dieta hipercalórica se correlaciona con el desarrollo de un comportamiento similar al adictivo a la comida y favorecen la herencia transgeneracional del fenotipo adictivo en ratas.

## X. PERSPECTIVAS

- Modular el comportamiento adictivo mediante inyección intracerebral de:
  - IFN $\alpha$ : como activador de la vía del interferón de tipo I en el NAc de la descendencia de madres CD y CAF; esperando que esto promueva el incremento en el comportamiento motivante hacia la presión de la palanca para la obtención de recompensas calóricas (pellets de chocolate).
  - anti-IFNAR1 (Anticuerpo neutralizante de la vía de interferón tipo I): como represor de la vía del interferón tipo I en el NAc de la descendencia de madres CD y CAF; esperando que esto disminuya el comportamiento motivante hacia la presión de la palanca para la obtención de recompensas calóricas (pellets de chocolate).



## XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1. **Montalvo-Martínez, L.**, Maldonado-Ruiz, R., Cárdenas-Tueme, M., Reséndez-Pérez, D., & Camacho, A. (2018). Maternal Overnutrition Programs Central Inflammation and Addiction-Like Behavior in Offspring. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8061389>
2. Maldonado-Ruiz, R., **Montalvo-Martínez, L.**, Fuentes-Mera, L., & Camacho, A. (2017). Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes. *Nutrition & Diabetes*, 7(3), e254. <https://doi.org/10.1038/nutd.2017.10>
3. Cruz-carrillo, G., **Montalvo-Martínez, L.**, Cárdenas-tueme, M., Bernal-vega, S., Maldonado-ruiz, R., Reséndez-pérez, D., ... Garza-ocañas, L. (2020). Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats, 14(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00452>
4. Camacho, A., **Montalvo-Martínez, L.**, Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., & Garza-Ocanas, L. (2017). Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in offspring. *Behavioural Brain Research*, 330, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.014>
5. Cárdenas-Tueme, M., **Montalvo-Martínez, L.**, Maldonado-Ruiz, R., Camacho-Morales, A., & Reséndez-Pérez, D. (2020). Neurodegenerative Susceptibility During Maternal Nutritional Programing: Are Central and Peripheral Innate Immune Training Relevant? *Frontiers in Neuroscience*, 14(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00013>
6. Maldonado-Ruiz, R., Cárdenas-Tueme, M., **Montalvo-Martínez, L.**, Vidal Tamayo, R., Garza-Ocañas, L., Reséndez-Pérez, D., & Camacho, A. (2019). Priming of hypothalamic ghrelin signaling and microglia activation exacerbate feeding in rats' offspring following maternal overnutrition. *Nutrients*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/nu11061241>

7. Castro-Zavala, A., Martín-Sánchez, A., **Montalvo-Martínez, L.**, Camacho-Morales, A., & Valverde, O. (2021). Cocaine-seeking behaviour is differentially expressed in male and female mice exposed to maternal separation and is associated with alterations in AMPA receptors subunits in the medial prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 109, 110262. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110262>
  
8. Maldonado-Ruiz R, Trujillo-Villarreal LA, **Montalvo-Martínez L**, Mercado-Gómez OF, Arriaga-Ávila V, Garza-Ocañas L, Ortiz-López R, Garza-Villarreal EA, Guevara-Guzmán R, Camacho-Morales A. MCP-1 Signaling Disrupts Social Behavior by Modulating Brain Volumetric Changes and Microglia Morphology. *Mol Neurobiol*. 2022 Feb;59(2):932-949. doi: 10.1007/s12035-021-02649-7. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34797523.

## XII. REFERENCIAS

- Arpon, A, J I Riezu-Boj, F I Milagro, A Marti, C Razquin, M A Martinez-Gonzalez, D Corella, et al. 2016. “Adherence to Mediterranean Diet Is Associated with Methylation Changes in Inflammation-Related Genes in Peripheral Blood Cells.” *Journal of Physiology and Biochemistry* 73 (3): 445–55. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0552-6>.
- Attarzadeh-Yazdi, Ghassem, Reza Arezoomandan, and Abbas Haghparast. 2014. “Minocycline, an Antibiotic with Inhibitory Effect on Microglial Activation, Attenuates the Maintenance and Reinstatement of Methamphetamine-Seeking Behavior in Rat.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 53 (August): 142–48. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.04.008>.
- Aw, Ernest, Yingying Zhang, and Michael Carroll. 2020. “Microglial Responses to Peripheral Type 1 Interferon.” *Journal of Neuroinflammation* 17 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02003-z>.
- Bale, Tracy L. 2015a. “Epigenetic and Transgenerational Reprogramming of Brain Development.” *Nature Reviews. Neuroscience* 16 (6): 332–44. <https://doi.org/10.1038/nrn3818>.
- . 2015b. “Epigenetic and Transgenerational Reprogramming of Brain Development.” *Nature Publishing Group*, no. April. <https://doi.org/10.1038/nrn3818>.
- Bale, Tracy L, Tallie Z Baram, Alan S Brown, Jill M Goldstein, Thomas R Insel, Margaret M McCarthy, Charles B Nemeroff, et al. 2010. “Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders.” *Biological Psychiatry* 68 (4): 314–19. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.028>.
- Barker, D J. 1998. “In Utero Programming of Chronic Disease.” *Clinical Science (London, England : 1979)* 95 (2): 115–28.
- Baruch, Kuti, Aleksandra Deczkowska, Eyal David, Joseph M Castellano, Omer Miller, Alexander Kertser, Tamara Berkutzki, et al. 2014. “Aging. Aging-Induced Type I Interferon Response at the Choroid Plexus Negatively Affects Brain Function.” *Science (New York, N.Y.)* 346 (6205): 89–93. <https://doi.org/10.1126/science.1252945>.
- Ben-Yehuda, Hila, Orit Matcovitch-Natan, Alexander Kertser, Amit Spinrad, Marco Prinz, Ido Amit, and Michal Schwartz. 2020. “Maternal Type-I Interferon Signaling

- Adversely Affects the Microglia and the Behavior of the Offspring Accompanied by Increased Sensitivity to Stress.” *Molecular Psychiatry* 25 (5): 1050–67. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0604-0>.
- Berridge, Kent C., and Terry E. Robinson. 1998. “What Is the Role of Dopamine in Reward: Hedonic Impact, Reward Learning, or Incentive Saliency?” *Brain Research Reviews* 28 (3): 309–69. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00019-8).
- Berridge, Kent C. 2007. “The Debate over Dopamine’s Role in Reward: The Case for Incentive Saliency.” *Psychopharmacology* 191 (3): 391–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0578-x>.
- Berthoud, Hans Rudolf. 2004. “Neural Control of Appetite: Cross-Talk between Homeostatic and Non-Homeostatic Systems.” *Appetite* 43 (3): 315–17. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2004.04.009>.
- . 2007. “Interactions between the ‘Cognitive’ and ‘Metabolic’ Brain in the Control of Food Intake.” *Physiology and Behavior* 91 (5): 486–98. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.016>.
- Bialas, Allison R, Jessy Presumey, Abhishek Das, Cees E van der Poel, Peter H Lapchak, Luka Mesin, Gabriel Victora, et al. 2017. “Microglia-Dependent Synapse Loss in Type I Interferon-Mediated Lupus.” *Nature* 546 (7659): 539–43. <https://doi.org/10.1038/nature22821>.
- Blank, Thomas, and Marco Prinz. 2017. “Type I Interferon Pathway in CNS Homeostasis and Neurological Disorders.” *Glia* 65 (9): 1397–1406. <https://doi.org/10.1002/glia.23154>.
- Bohacek, Johannes, and Isabelle M Mansuy. 2015. “Molecular Insights into Transgenerational Non-Genetic Inheritance of Acquired Behaviours.” *Nat Rev Genet* 16 (11): 641–52. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3964>.
- Brown, Kyle T, Sophia C Levis, Casey E O’Neill, Alexis L Northcutt, Timothy J Fabisiak, Linda R Watkins, and Ryan K Bachtell. 2018. “Innate Immune Signaling in the Ventral Tegmental Area Contributes to Drug-Primed Reinstatement of Cocaine Seeking.” *Brain, Behavior, and Immunity* 67 (January): 130–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.012>.
- Buckman, Laura B., Alyssa H. Hasty, David K. Flaherty, Christopher T. Buckman, Misty M. Thompson, Brittany K. Matlock, Kevin Weller, and Kate L J Ellacott. 2014.

- “Obesity Induced by a High-Fat Diet Is Associated with Increased Immune Cell Entry into the Central Nervous System.” *Brain, Behavior, and Immunity* 35: 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.06.007>.
- Camacho, Alberto, Larisa Montalvo-Martinez, Robbi E Cardenas-Perez, Lizeth Fuentes-Mera, and Lourdes Garza-Ocanas. 2017. “Obesogenic Diet Intake during Pregnancy Programs Aberrant Synaptic Plasticity and Addiction-like Behavior to a Palatable Food in Offspring.” *Behavioural Brain Research* 330 (July): 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.014>.
- Cardenas-Perez, Robbi E., Lizeth Fuentes-Mera, Ana Laura De La Garza, Ivan Torre-Villalvazo, Luis A. Reyes-Castro, Humberto Rodriguez-Rocha, Aracely Garcia-Garcia, et al. 2018. “Maternal Overnutrition by Hypercaloric Diets Programs Hypothalamic Mitochondrial Fusion and Metabolic Dysfunction in Rat Male Offspring.” *Nutrition and Metabolism* 15 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0279-6>.
- Chen, Jia-Xin, Kang-Mei Huang, Meng Liu, Jin-Xiang Jiang, Jian-Peng Liu, Yu-Xiang Zhang, Chen Yang, Wen-Jun Xin, and Xue-Qin Zhang. 2017. “Activation of TLR4/STAT3 Signaling in VTA Contributes to the Acquisition and Maintenance of Morphine-Induced Conditioned Place Preference.” *Behavioural Brain Research* 335 (September): 151–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.022>.
- Christ, Anette, Patrick Günther, Mario A.R. Lauterbach, Peter Duewell, Debjani Biswas, Karin Pelka, Claus J. Scholz, et al. 2018. “Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming.” *Cell* 172 (1–2): 162–175.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.013>.
- Ciaccia, Laura. 2010. *Fundamentals of Inflammation*. Edited by Derek W. Charles N. Serhan, Peter A. Ward. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. Vol. 1. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1097/00000433-198206000-00020>.
- Claycombe, Kate J, Catherine A Brissette, and Othman Ghribi. 2015. “Epigenetics of Inflammation, Maternal Infection, and Nutrition.” *The Journal of Nutrition* 145 (5): 1109S–1115S. <https://doi.org/10.3945/jn.114.194639>.
- Colonna, Marco, and Oleg Butovsky. 2017. “Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration.” *Annual Review of Immunology* 35 (April): 441–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.
- Crawford, Fiona C., Marcie L. Wood, Sarah E. Wilson, Venkatarajan S. Mathura, Tyler R.

- Hollen, Freya Geall, Deepak N. Kolippakkam, and Michael J. Mullan. 2006. "Cocaine Induced Inflammatory Response in Human Neuronal Progenitor Cells." *Journal of Neurochemistry* 97 (3): 662–74. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03760.x>.
- Cruz-carrillo, Gabriela, Larisa Montalvo-martínez, Marcela Cárdenas-tueme, Sofia Bernal-vega, Roger Maldonado-ruiz, Diana Reséndez-pérez, Dalia Rodríguez-ríos, Gertrud Lund, and Lourdes Garza-ocañas. 2020. "Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats" 14 (June): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00452>.
- Deczkowska, Aleksandra, Orit Matcovitch-Natan, Afroditi Tsitsou-Kampeli, Sefi Ben-Hamo, Raz Dvir-Szternfeld, Amit Spinrad, Oded Singer, et al. 2017. "Mef2C Restrains Microglial Inflammatory Response and Is Lost in Brain Ageing in an IFN-I-Dependent Manner." *Nature Communications* 8 (1): 717. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00769-0>.
- Deng, Jie V, Ramona M Rodriguiz, Ashley N Hutchinson, Il-Hwan Kim, William C Wetsel, and Anne E West. 2010. "MeCP2 in the Nucleus Accumbens Contributes to Neural and Behavioral Responses to Psychostimulants." *Nature Neuroscience* 13 (9): 1128–36. <https://doi.org/10.1038/nn.2614>.
- Diamond, Michael S., and Michael Farzan. 2013. "The Broad-Spectrum Antiviral Functions of IFIT and IFITM Proteins." *Nature Reviews Immunology* 13 (1): 46–57. <https://doi.org/10.1038/nri3344>.
- Donkin, Ida, Soetkin Versteyhe, Lars R. Ingerslev, Kui Qian, Mie Mechta, Loa Nordkap, Brynjulf Mortensen, et al. 2016. "Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans." *Cell Metabolism* 23 (2): 369–78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.004>.
- Edlow, Andrea G. 2017. "Maternal Obesity and Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders in Offspring." *Prenatal Diagnosis* 37 (1): 95–110. <https://doi.org/10.1002/pd.4932>.
- Ejlerskov, Patrick, Jeanette Göransdotter Hultberg, Jun Yang Wang, Robert Carlsson, Malene Ambjørn, Martin Kuss, Yawei Liu, et al. 2015. "Lack of Neuronal IFN- $\beta$ -IFNAR Causes Lewy Body- and Parkinson's Disease-like Dementia." *Cell* 163 (2): 324–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.069>.
- Ersche, Karen D, P Simon Jones, Guy B Williams, Abigail J Turton, Trevor W Robbins, and

- Edward T Bullmore. 2012. "Abnormal Brain Structure Implicated in Stimulant Drug Addiction." *Science (New York, N.Y.)* 335 (6068): 601–4. <https://doi.org/10.1126/science.1214463>.
- Eun, Jung Woo, Seung Jun Kwack, Ji Heon Noh, Kwang Hwa Jung, Jeong Kyu Kim, Hyun Jin Bae, Hongjian Xie, et al. 2010. "Identification of Post-Generation Effect of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine on the Mouse Brain by Large-Scale Gene Expression Analysis." *Toxicology Letters* 195 (1): 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.013>.
- Fensterl, Volker, and Ganes C. Sen. 2011. "The *ISG56/IFIT1* Gene Family." *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31 (1): 71–78. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0101>.
- Gajewski, Paula A, Gustavo Turecki, and Alfred J Robison. 2016. "Differential Expression of FosB Proteins and Potential Target Genes in Select Brain Regions of Addiction and Depression Patients," 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160355>.
- Git, K. C.G. de, and R. A.H. Adan. 2015. "Leptin Resistance in Diet-Induced Obesity: The Role of Hypothalamic Inflammation." *Obesity Reviews* 16 (3): 207–24. <https://doi.org/10.1111/obr.12243>.
- Glendining, Kelly A, Lorryn C Fisher, and Christine L Jasoni. 2018. "Maternal High Fat Diet Alters Offspring Epigenetic Regulators, Amygdala Glutamatergic Profile and Anxiety." *Psychoneuroendocrinology* 96 (October): 132–41. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.06.015>.
- Goldmann, Tobias, Nicolas Zeller, Jenni Raasch, Katrin Kierdorf, Kathrin Frenzel, Lars Ketscher, Anja Basters, et al. 2015. "USP18 Lack in Microglia Causes Destructive Interferonopathy of the Mouse Brain." *The EMBO Journal* 34 (12): 1612–29. <https://doi.org/10.15252/embj.201490791>.
- Guerrero-Bosagna, Carlos and SkinnerMichael K. 2013. "Inheritance of Phenotype and Disease." *Mol Cell Endocrinol* 354 (1–2): 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.004>. Environmentally.
- Guerrero-Bosagna, Carlos, and Michael K Skinner. 2012. "Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Phenotype and Disease." *Molecular and Cellular Endocrinology* 354 (1): 3–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.004>.
- Gutiérrez-Martos, Miriam, Benoit Girard, Sueli Mendonça-Netto, Julie Perroy, Emmanuel

- Valjent, Rafael Maldonado, and Miquel Martin. 2017. “Cafeteria Diet Induces Neuroplastic Modifications in the Nucleus Accumbens Mediated by Microglia Activation.” *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12541>.
- Hales, C N, and D J Barker. 2001. “The Thrifty Phenotype Hypothesis.” *British Medical Bulletin* 60: 5–20.
- Hao, Shuai, Aditi Dey, Xiaolin Yu, and Alexis M Stranahan. 2016. “Brain , Behavior , and Immunity Dietary Obesity Reversibly Induces Synaptic Stripping by Microglia and Impairs Hippocampal Plasticity.” *Brain Behavior and Immunity* 51: 230–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.023>.
- Hauck, Carolin, Brian Cook, and Thomas Ellrott. 2020. “Food Addiction, Eating Addiction and Eating Disorders.” *Proceedings of the Nutrition Society* 79 (1): 103–12. <https://doi.org/10.1017/S0029665119001162>.
- Hellwig, Sabine, Simone Brioschi, Sandra Dieni, Lars Frings, Annette Masuch, Thomas Blank, and Knut Biber. 2016. “Altered Microglia Morphology and Higher Resilience to Stress-Induced Depression-like Behavior in CX3CR1-Deficient Mice.” *Brain, Behavior, and Immunity* 55: 126–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.008>.
- Hinwood, M., J. Morandini, T. A. Day, and F. R. Walker. 2012. “Evidence That Microglia Mediate the Neurobiological Effects of Chronic Psychological Stress on the Medial Prefrontal Cortex.” *Cerebral Cortex* 22 (6): 1442–54. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr229>.
- Holland, Michelle L, Robert Lowe, Paul W Caton, Carolina Gemma, Guillermo Carbajosa, Amy F Danson, Asha A M Carpenter, Elena Loche, Susan E Ozanne, and Vardhman K Rakyant. 2016. “Early-Life Nutrition Modulates the Epigenetic State of Specific RDNA Genetic Variants in Mice.” *Science (New York, N.Y.)* 353 (6298): 495–98. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7040>.
- Hosseini, Shirin, Kristin Michaelsen-Preusse, Gayane Grigoryan, Chintan Chhatbar, Ulrich Kalinke, and Martin Korte. 2020. “Type I Interferon Receptor Signaling in Astrocytes Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitive Function of the Healthy CNS.” *Cell Reports* 31 (7): 107666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107666>.
- Im, Heh-In, Jonathan A Hollander, Purva Bali, and Paul J Kenny. 2010. “MeCP2 Controls BDNF Expression and Cocaine Intake through Homeostatic Interactions with MicroRNA-212.” *Nature Neuroscience* 13 (9): 1120–27.



<https://doi.org/10.1038/nn.2615>.

- J.R., Gugusheff, Bae S.E., Rao A., Clarke I.J., Poston L., Taylor P.D., Coen C.W., and Muhlhausler B.S. 2016. “Sex and Age-Dependent Effects of a Maternal Junk Food Diet on the Mu-Opioid Receptor in Rat Offspring.” *Behavioural Brain Research*.
- Jaenisch, Rudolf, and Adrian Bird. 2003. “Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals.” *Nature Genetics* 33 Suppl (March): 245–54. <https://doi.org/10.1038/ng1089>.
- Jasiulionis, Miriam G. 2018. “Abnormal Epigenetic Regulation of Immune System during Aging.” *Frontiers in Immunology* 9 (FEB): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00197>.
- Jr, Martin G Myers, and David P Olson. 2014. “SnapShot : Neural Pathways That Control Feeding SnapShot : Neural Pathways That Control Feeding.” *CMET* 19 (4): 732-732.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.015>.
- Karperien, A. L., H. F. Jelinek, and A. M. Buchan. 2008. “Box-Counting Analysis of Microglia Form in Schizophrenia, Alzheimer’s Disease and Affective Disorder.” *Fractals* 16 (2): 103–7. <https://doi.org/10.1142/S0218348X08003880>.
- Kenny, Paul J. 2011a. “Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions” 69 (4): 664–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.016.Reward>.
- . 2011b. “Common Cellular and Molecular Mechanisms in Obesity and Drug Addiction.” *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (11): 638–51. <https://doi.org/10.1038/nrn3105>.
- Kleinnijenhuis, Johanneke, Jessica Quintin, Frank Preijers, Leo A B Joosten, Daniela C Ifrim, Sadia Saeed, Cor Jacobs, et al. 2012. “Bacille Calmette-Guerin Induces NOD2-Dependent Nonspecific Protection from Reinfection via Epigenetic Reprogramming of Monocytes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (43): 17537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>.
- Koob, George F., and Nora D. Volkow. 2016. “Neurobiology of Addiction: A Neurocircuitry Analysis.” *The Lancet Psychiatry* 3 (8): 760–73. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8).
- Koob, George F, and Nora D Volkow. 2010. “Neurocircuitry of Addiction.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (1): 217–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.4>.

- Koss, Kyle, Matthew A. Churchward, Christopher Tsui, and Kathryn G. Todd. 2019. “In Vitro Priming and Hyper-Activation of Brain Microglia: An Assessment of Phenotypes.” *Molecular Neurobiology* 56 (9): 6409–25. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1529-y>.
- Kumar, Arvind, Kwang-Ho Choi, William Renthal, Nadia M Tsankova, David E H Theobald, Hoang-Trang Truong, Scott J Russo, et al. 2005. “Chromatin Remodeling Is a Key Mechanism Underlying Cocaine-Induced Plasticity in Striatum.” *Neuron* 48 (2): 303–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.023>.
- la Garza, Ana Laura de, Miguel A. Garza-Cuellar, Ivan A. Silva-Hernandez, Robbi E. Cardenas-Perez, Luis A. Reyes-Castro, Elena Zambrano, Brenda Gonzalez-Hernandez, Lourdes Garza-Ocañas, Lizeth Fuentes-Mera, and Alberto Camacho. 2019. “Maternal Flavonoids Intake Reverts Depression-like Behaviour in Rat Female Offspring.” *Nutrients* 11 (3): 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11030572>.
- LaPlant, Quincey, Vincent Vialou, Herbert E 3rd Covington, Dani Dumitriu, Jian Feng, Brandon L Warren, Ian Maze, et al. 2010. “Dnmt3a Regulates Emotional Behavior and Spine Plasticity in the Nucleus Accumbens.” *Nature Neuroscience* 13 (9): 1137–43. <https://doi.org/10.1038/nn.2619>.
- Le, Qiumin, Biao Yan, Xiangchen Yu, Yanqing Li, Haikun Song, Huiwen Zhu, Weiqing Hou, et al. 2017. “Drug-Seeking Motivation Level in Male Rats Determines Offspring Susceptibility or Resistance to Cocaine-Seeking Behaviour.” *Nature Communications* 8 (May): 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms15527>.
- Lépinay, Amandine L., Thomas Larrieu, Corinne Joffre, Niyazi Acar, Iciar Gárate, Nathalie Castanon, Guillaume Ferreira, et al. 2015. “Perinatal High-Fat Diet Increases Hippocampal Vulnerability to the Adverse Effects of Subsequent High-Fat Feeding.” *Psychoneuroendocrinology* 53: 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.12.008>.
- Lewitus, Gil M., Sarah C. Konefal, Andrew D. Greenhalgh, Horia Pribiag, Keanan Augereau, and David Stellwagen. 2016. “Microglial TNF- $\alpha$  Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization.” *Neuron* 90 (3): 483–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.030>.
- Li, Xia, Qian Zhang, Qingzhu Shi, Yin Liu, Kai Zhao, Qicong Shen, Yang Shi, et al. 2017. “Demethylase Kdm6a Epigenetically Promotes IL-6 and IFN- $\beta$  Production in

- Macrophages.” *Journal of Autoimmunity* 80: 85–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.02.007>.
- Lindgren, Elsa, Kyle Gray, Gregg Miller, Ryan Tyler, Corinde E Wiers, Nora D Volkow, and Gene-Jack Wang. 2018. “Food Addiction: A Common Neurobiological Mechanism with Drug Abuse.” *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 23 (January): 811–36. <https://doi.org/10.2741/4618>.
- Loxton, Natalie J, and Renée J Tipman. 2017. “Reward Sensitivity and Food Addiction in Women.” *Appetite* 115 (August): 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.10.022>.
- Ludwig, D S. 2001. “Relation between Consumption of Sugar Sweetened Drinks and Childhood Obesity: A Prospective Observational Analysis.” *Lancet* 357 (9255): 505–8.
- Lyman, Monty, Dafydd G. Lloyd, Xunming Ji, Marcela P. Vizcaychipi, and Daqing Ma. 2014. “Neuroinflammation: The Role and Consequences.” *Neuroscience Research* 79 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>.
- Maldonado-Ruiz, Roger, Marcela Cárdenas-Tueme, Larisa Montalvo-Martínez, Roman Vidaltamayo, Lourdes Garza-Ocañas, Diana Reséndez-Perez, and Alberto Camacho. 2019. “Priming of Hypothalamic Ghrelin Signaling and Microglia Activation Exacerbate Feeding in Rats’ Offspring Following Maternal Overnutrition.” *Nutrients* 11 (6). <https://doi.org/10.3390/nu11061241>.
- Martianova, E., V. A. Aniol, A. O. Manolova, A. A. Kvichansky, and N. V. Gulyaeva. 2019. “Activation of Microglia Associated with Lentiviral Transduction: A Semiautomated Method of Assessment.” *Acta Histochemica* 121 (3): 368–75. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.01.008>.
- Martire, Sarah I., Jayanthi Maniam, Timothy South, Nathan Holmes, R. Fred Westbrook, and Margaret J. Morris. 2014. “Extended Exposure to a Palatable Cafeteria Diet Alters Gene Expression in Brain Regions Implicated in Reward, and Withdrawal from This Diet Alters Gene Expression in Brain Regions Associated with Stress.” *Behavioural Brain Research* 265: 132–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.027>.
- Maze, Ian, and Eric J Nestler. 2011. “The Epigenetic Landscape of Addiction.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1216 (January): 99–113. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05893.x>.
- Mesquita, Sandro Dá, Ana C Ferreira, Fuying Gao, Giovanni Coppola, Daniel H Geschwind,

- João C Sousa, Margarida Correia-Neves, Nuno Sousa, Joana A Palha, and Fernanda Marques. 2015. “The Choroid Plexus Transcriptome Reveals Changes in Type I and II Interferon Responses in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease.” *Brain, Behavior, and Immunity* 49 (October): 280–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.008>.
- Milanski, Marciane, Ana P. Arruda, Andressa Coope, Letícia M. Ignacio-Souza, Carla E. Nunez, Erika A. Roman, Talita Romanatto, et al. 2012. “Inhibition of Hypothalamic Inflammation Reverses Diet-Induced Insulin Resistance in the Liver.” *Diabetes* 61 (6): 1455–62. <https://doi.org/10.2337/db11-0390>.
- Milanski, Marciane, Giovanna Degasperi, Andressa Coope, Joseane Morari, Raphael Denis, Dennys E. Cintra, Daniela M.L. Tsukumo, et al. 2009. “Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity.” *Journal of Neuroscience* 29 (2): 359–70. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009>.
- Montalvo-Martínez, Larisa, Roger Maldonado-Ruiz, Marcela Cárdenas-Tueme, Diana Reséndez-Pérez, and Alberto Camacho. 2018. “Maternal Overnutrition Programs Central Inflammation and Addiction-Like Behavior in Offspring.” *BioMed Research International* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8061389>.
- Mostafavi, S, A Battle, X Zhu, J B Potash, M M Weissman, J Shi, K Beckman, et al. 2014. “Type I Interferon Signaling Genes in Recurrent Major Depression: Increased Expression Detected by Whole-Blood RNA Sequencing.” *Molecular Psychiatry* 19 (12): 1267–74. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.161>.
- Naef, L., L. Moquin, G. Dal Bo, B. Giros, A. Gratton, and C. D. Walker. 2011. “Maternal High-Fat Intake Alters Presynaptic Regulation of Dopamine in the Nucleus Accumbens and Increases Motivation for Fat Rewards in the Offspring.” *Neuroscience* 176: 225–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.037>.
- Nallar, Shreeram C., and Dhan V. Kalvakolanu. 2014. “Interferons, Signal Transduction Pathways, and the Central Nervous System.” *Journal of Interferon and Cytokine Research* 34 (8): 559–76. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0021>.
- Nestler, Eric J. 2014. “Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction.” *Neuropharmacology* 76 (PART B): 259–268. Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanism. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.004>.
- Netea, Mihai G., Jessica Quintin, and Jos W M Van Der Meer. 2011. “Trained Immunity: A

- Memory for Innate Host Defense.” *Cell Host and Microbe* 9 (5): 355–61. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.
- Ong, Z Y, and B S Muhlhausler. 2011. “Maternal ‘ Junk-Food ’ Feeding of Rat Dams Alters Food Choices and Development of the Mesolimbic Reward Pathway in the Offspring.” *FASEB J* 25 (7): 2167–2179. <https://doi.org/10.1096/fj.10-178392>.
- Ong, Zhi Yi, Ayumi F Wanasuria, Mark Z P Lin, Jennifer Hiscock, and Beverly S Muhlhausler. 2013. “Chronic Intake of a Cafeteria Diet and Subsequent Abstinence. Sex-Specific Effects on Gene Expression in the Mesolimbic Reward System.” *Appetite* 65 (June): 189–99. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.01.014>.
- Peleg-Raibstein, D, G Sarker, K Litwan, S D Krämer, S M Ametamey, R Schibli, and C Wolfrum. 2016. “Enhanced Sensitivity to Drugs of Abuse and Palatable Foods Following Maternal Overnutrition.” *Translational Psychiatry* 6 (October): e911. <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2016.176>.
- Pierce, R Christopher, Bruno Fant, Sarah E Swinford-Jackson, Elizabeth A Heller, Wade H Berrettini, and Mathieu E Wimmer. 2018. “Environmental, Genetic and Epigenetic Contributions to Cocaine Addiction.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 43 (7): 1471–80. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0008-x>.
- Ransohoff, Richard M. 2016. “How Neuroinflammation Contributes to Neurodegeneration.” *Science (New York, N.Y.)* 353 (6301): 777–83. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>.
- Renthal, William, and Eric J Nestler. 2009. “Histone Acetylation in Drug Addiction.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (4): 387–94. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.005>.
- Rijlaarsdam, Jolien, Charlotte A M Cecil, Esther Walton, Maurissa S C Mesirow, Caroline L. Relton, Tom R. Gaunt, Wendy Mcardle, and Edward D. Barker. 2016. “Prenatal Unhealthy Diet, Insulin-like Growth Factor 2 Gene (IGF2) Methylation, and Attention Deficit Hyperactivity Disorder Symptoms in Youth with Early-Onset Conduct Problems.” *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12589>.
- Robison, Alfred J, and Eric J Nestler. 2011. “Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Addiction.” *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (11): 623–37.

<https://doi.org/10.1038/nrn3111>.

- Roy, Ethan R., Baiping Wang, Ying Wooi Wan, Gabriel Chiu, Allysa Cole, Zhuoran Yin, Nicholas E. Propson, et al. 2020. "Type I Interferon Response Drives Neuroinflammation and Synapse Loss in Alzheimer Disease." *Journal of Clinical Investigation* 130 (4): 1912–30. <https://doi.org/10.1172/JCI133737>.
- Ruddock, Helen K, Matt Field, and Charlotte A Hardman. 2017. "Exploring Food Reward and Calorie Intake in Self-Perceived Food Addicts." *Appetite* 115 (August): 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.003>.
- Russo, Scott J, and Eric J Nestler. 2013. "The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders." *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>.
- Salter, Michael W, and Beth Stevens. 2017. "Microglia Emerge as Central Players in Brain Disease." *Nature Medicine* 23 (9): 1018–27. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>.
- Samir, Parimal, R. K.Subbarao Malireddi, and Thirumala Devi Kanneganti. 2018. "Food for Training—Western Diet and Inflammatory Memory." *Cell Metabolism* 27 (3): 481–82. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.012>.
- Sarker, Gitalee, Rebecca Berrens, Judith von Arx, Pawel Pelczar, Wolf Reik, Christian Wolfrum, and Daria Peleg-Raibstein. 2018. "Transgenerational Transmission of Hedonic Behaviors and Metabolic Phenotypes Induced by Maternal Overnutrition." *Translational Psychiatry* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0243-2>.
- Sarker, Gitalee, Kathrin Litwan, Rahel Kastli, and Daria Peleg-Raibstein. 2019. "Maternal Overnutrition during Critical Developmental Periods Leads to Different Health Adversities in the Offspring: Relevance of Obesity, Addiction and Schizophrenia." *Scientific Reports* 9 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53652-x>.
- Sarker, Gitalee, and Daria Peleg-Raibstein. 2019. "Maternal Overnutrition Induces Long-Term Cognitive Deficits across Several Generations." *Nutrients* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/nu11010007>.
- Schafer, Dorothy P., and Beth Stevens. 2015. "Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020545>.
- Schultz, Wolfram. 2007. "Behavioral Dopamine Signals." *Trends in Neurosciences* 30 (5): 203–10. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.007>.
- Schwarz, Jaclyn M, Susan H Smith, and Staci D Bilbo. 2013. "FACS Analysis of Neuronal-

- Glial Interactions in the Nucleus Accumbens Following Morphine Administration.” *Psychopharmacology* 230 (4): 525–35. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3180-z>.
- Smith, Joshua A, Arabinda Das, Swapan K Ray, and Naren L Banik. 2012. “Role of Pro-Inflammatory Cytokines Released from Microglia in Neurodegenerative Diseases.” *Brain Research Bulletin* 87 (1): 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>.
- Smith, Kristie Leigh, Mustafa S. Kassem, David J. Clarke, Michael P. Kuligowski, Miguel A. Bedoya-Pérez, Stephanie M. Todd, Jim Lagopoulos, Maxwell R. Bennett, and Jonathon C. Arnold. 2019. “Microglial Cell Hyper-Ramification and Neuronal Dendritic Spine Loss in the Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex in a Mouse Model of PTSD.” *Brain, Behavior, and Immunity* 80 (May): 889–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.042>.
- Snider, Sarah E, Elizabeth S Hendrick, and Patrick M Beardsley. 2013. “Glial Cell Modulators Attenuate Methamphetamine Self-Administration in the Rat.” *European Journal of Pharmacology* 701 (1–3): 124–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.016>.
- Su, Kuan-Pin, Hsueh-Chou Lai, Cheng-Yuan Peng, Wen-Pang Su, Jane Pei-Chen Chang, and Carmine M Pariante. 2019. “Interferon-Alpha-Induced Depression: Comparisons between Early- and Late-Onset Subgroups and with Patients with Major Depressive Disorder.” *Brain, Behavior, and Immunity* 80 (August): 512–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.032>.
- Sullivan, Elinor L., Elizabeth K. Nousen, and Katherine A. Chamlou. 2014. “Maternal High Fat Diet Consumption during the Perinatal Period Programs Offspring Behavior.” *Physiology and Behavior* 123: 236–42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.07.014>.
- Szyf, Moshe. 2015. “Nongenetic Inheritance and Transgenerational Epigenetics.” *Trends in Molecular Medicine* 21 (2): 134–44. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.004>.
- Tanda, Gianluigi, Maddalena Mereu, Takato Hiranita, Juliana C Quarterman, Mark Coggiano, and Jonathan L Katz. 2016. “Lack of Specific Involvement of (+)-Naloxone and (+)-Naltrexone on the Reinforcing and Neurochemical Effects of Cocaine and Opioids.” *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41 (11): 2772–81. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.91>.
- Taylor, Juliet M, Myles R Minter, Andrew G Newman, Moses Zhang, Paul A Adlard, and

- Peter J Crack. 2014. "Type-1 Interferon Signaling Mediates Neuro-Inflammatory Events in Models of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 35 (5): 1012–23. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.089>.
- Taylor, Juliet M, Zachery Moore, Myles R Minter, and Peter J Crack. 2018. "Type-I Interferon Pathway in Neuroinflammation and Neurodegeneration: Focus on Alzheimer's Disease." *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)* 125 (5): 797–807. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1745-4>.
- Teegarden, S L, A N Scott, and T L Bale. 2009. "Early Life Exposure to a High Fat Diet Promotes Long-Term Changes in Dietary Preferences and Central Reward Signaling." *Neuroscience* 162 (4): 924–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.029>.
- Tracy, Linda M., Filip Bergqvist, Elena V. Ivanova, Kristin T. Jacobsen, and Kerstin Iverfeldt. 2013. "Exposure to the Saturated Free Fatty Acid Palmitate Alters BV-2 Microglia Inflammatory Response." *Journal of Molecular Neuroscience* 51 (3): 805–12. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0068-7>.
- Trujillo-Villarreal, Luis A., Viktor J. Romero-Díaz, Iván Alberto Marino-Martínez, Lizeth Fuentes-Mera, Marco Antonio Ponce-Camacho, Gabriel A. Devenyi, M. Mallar Chakravarty, Alberto Camacho-Morales, and Eduardo E. Garza-Villarreal. 2021. "Maternal Cafeteria Diet Exposure Primes Depression-like Behavior in the Offspring Evoking Lower Brain Volume Related to Changes in Synaptic Terminals and Gliosis." *Translational Psychiatry* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01157-x>.
- Tse, Edmund, Karla J. Helbig, Kylie Van Der Hoek, Erin M. McCartney, Mark Van Der Hoek, Jacob George, and Michael R. Beard. 2015. "Fatty Acids Induce a Pro-Inflammatory Gene Expression Profile in Huh-7 Cells That Attenuates the Anti-HCV Action of Interferon." *Journal of Interferon and Cytokine Research* 35 (5): 392–400. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0165>.
- Valdearcos, Martin, John D Douglass, Megan M Robblee, Mauricio D Dorfman, Daniel R Stifler, Mariko L Bennett, Irene Gerritse, et al. 2017. "Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility." *Cell Metabolism* 26 (1): 185–97. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.015>.Microglial.
- Valdearcos, Martin, Megan M Robblee, Daniel I Benjamin, Daniel K Nomura, Allison W Xu, and Suneil K Koliwad. 2014. "Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat



- Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function.” *Cell Reports* 9 (6): 2124–38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.018>.
- Vassoler, F M, and G Sadri-Vakili. 2014. “Mechanisms of Transgenerational Inheritance of Addictive-like Behaviors.” *Neuroscience* 264 (April): 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.064>.
- Volkow, N D, G J Wang, J S Fowler, D Tomasi, and R Baler. 2012. “Food and Drug Reward: Overlapping Circuits in Human Obesity and Addiction.” *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 11: 1–24. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2011\\_169](https://doi.org/10.1007/7854_2011_169).
- Volkow, Nora D., Gene Jack Wang, and Ruben D. Baler. 2011. “Reward, Dopamine and the Control of Food Intake: Implications for Obesity.” *Trends in Cognitive Sciences* 15 (1): 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>.
- Volkow, Nora D, J S Fowler, G J Wang, R Baler, and F Telang. 2009. “Imaging Dopamine’s Role in Drug Abuse and Addiction.” *NIH Public Access* 56 (Suppl 1): 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022.Imaging>.
- Volkow, Nora D, Roy A Wise, and Ruben Baler. 2017. “The Dopamine Motive System: Implications for Drug and Food Addiction.” *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (12): 741–52. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>.
- Wake, Hiroaki, Andrew J Moorhouse, and Junichi Nabekura. 2011. “Functions of Microglia in the Central Nervous System--beyond the Immune Response.” *Neuron Glia Biology* 7 (1): 47–53. <https://doi.org/10.1017/S1740925X12000063>.
- Walker, Douglas G., and Lih-Fen Lue. 2015. “Immune Phenotypes of Microglia in Human Neurodegenerative Disease: Challenges to Detecting Microglial Polarization in Human Brains.” *Alzheimer’s Research & Therapy* 7 (1): 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0139-9>.
- Wang, Zhen, Dexiang Liu, Fuwu Wang, Shangming Liu, Shidou Zhao, Eng-Ang Ling, and Aijun Hao. 2012. “Saturated Fatty Acids Activate Microglia via Toll-like Receptor 4/NF-KB Signalling.” *The British Journal of Nutrition* 107 (2): 229–41. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002868>.
- Warneke, Wiebke, Susanne Klaus, Heidrun Fink, Simon C. Langley-Evans, and Jörg Peter Voigt. 2014. “The Impact of Cafeteria Diet Feeding on Physiology and Anxiety-Related Behaviour in Male and Female Sprague-Dawley Rats of Different Ages.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 116: 45–54.

<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.016>.

- West, Phillip K., Barney Viengkhou, Iain L. Campbell, and Markus J. Hofer. 2019. "Microglia Responses to Interleukin-6 and Type I Interferons in Neuroinflammatory Disease." *Glia* 67 (10): 1821–41. <https://doi.org/10.1002/glia.23634>.
- Wu, Kay L H, Chih Wei Wu, You Lin Tain, Li Tung Huang, Yung Mei Chao, Chun Ying Hung, Jin Cheng Wu, Siang Ru Chen, Pei Chia Tsai, and Julie Y H Chan. 2016. "Environmental Stimulation Rescues Maternal High Fructose Intake-Impaired Learning and Memory in Female Offspring: Its Correlation with Redistribution of Histone Deacetylase 4." *Neurobiology of Learning and Memory* 130: 105–17. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.02.004>.
- Yamamoto, Dorothy J., Anna M. Nelson, Bruce H. Mandt, Gaynor A. Larson, Jacki M. Rorabaugh, Christopher M.C. Ng, Kelsey M. Barcomb, Toni L. Richards, Richard M. Allen, and Nancy R. Zahniser. 2013. "Rats Classified as Low or High Cocaine Locomotor Responders: A Unique Model Involving Striatal Dopamine Transporters That Predicts Cocaine Addiction-like Behaviors." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37 (8): 1738–53. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.002>.
- Yanguas-Casás, Natalia, Andrea Crespo-Castrillo, Maria L. de Ceballos, Julie A. Chowen, Iñigo Azcoitia, Maria Angeles Arevalo, and Luis M. Garcia-Segura. 2018. "Sex Differences in the Phagocytic and Migratory Activity of Microglia and Their Impairment by Palmitic Acid." *Glia* 66 (3): 522–37. <https://doi.org/10.1002/glia.23263>.
- Zhang, Qian, and Xuetao Cao. 2019. "Epigenetic Regulation of the Innate Immune Response to Infection." *Nature Reviews Immunology* 19 (7): 417–32. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0151-6>.
- Zhou, Xiang, Jennifer J. Michal, Lifan Zhang, Bo Ding, Joan K. Lunney, Bang Liu, and Zhihua Jiang. 2013. "Interferon Induced IFIT Family Genes in Host Antiviral Defense." *International Journal of Biological Sciences* 9 (2): 200–208. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5613>.
- Ziebell, Jenna M, Helen Ray-jones, Jonathan Lifshitz, and Child Health. 2017. "Nogo Presence Is Inversely Associated with Shifts in Cortical Microglial Morphology Following Experimental Diffuse Brain Injury." *Neuroscience* 17 (359): 209–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.027.Nogo>.

