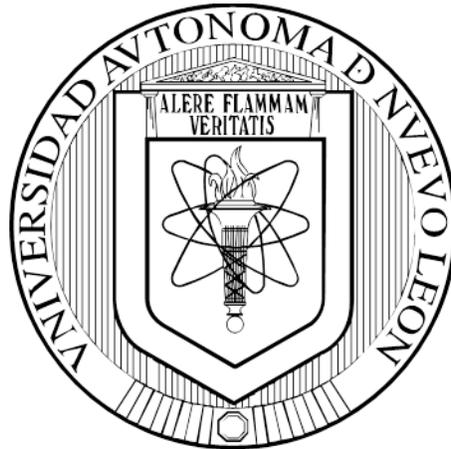


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**MODULACIÓN DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL ADN EN EL  
DESARROLLO DE CONDUCTAS ADICTIVAS EN UN MODELO DE RATA**

**POR  
Q.C.B GABRIELA CRUZ CARRILLO**

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

**JUNIO, 2019**

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



**MODULACIÓN DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL ADN EN EL  
DESARROLLO DE CONDUCTAS ADICTIVAS EN UN MODELO DE RATA**

**POR  
Q.C.B GABRIELA CRUZ CARRILLO**

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

**ASESOR  
DR. ALBERTO CAMACHO MORALES**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**JUNIO, 2019**

**Modulación del perfil de metilación del ADN en el desarrollo de conductas  
aditivas en un modelo de rata.**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES**

Director de tesis



---

**DRA.C. LIZETH FUENTES MERA**

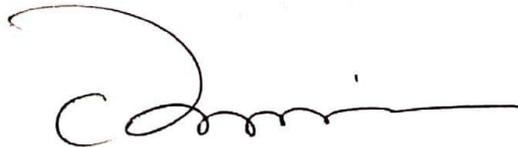
Co-director de tesis



---

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

Miembro de la comisión



---

**DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**

Subdirector de Estudios de Posgrado

**Modulación del perfil de metilación del ADN en el desarrollo de conductas  
adictivas en un modelo de rata.**

**Presentado por:**

**Q.C.B GABRIELA CRUZ CARRILLO**

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; así como en 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, la co-dirección de la Dra. Lizeth Fuentes Mera y como miembro de la Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret



---

**DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES**

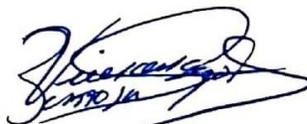
Director de tesis



---

**DRA.C. LIZETH FUENTES MERA**

Co-director de tesis



---

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

Miembro de la comisión

**DEDICATORIA:**

A mi familia y a todo aquel que desee leerla.

Gracias

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a:

- Dr. C. Alberto Camacho por el apoyo y confianza brindada durante estos meses y por siempre tener disponibilidad para enseñar.

-A mis Padres por estar cuando lo necesite y ayudarme en todo lo que estaba en sus manos para hacerlo más sencillo.

-A mi hermana Montse por sus comentarios y compañía siempre y en especial en estos dos años.

-A mis amigos y compañeros Larisa, Roger, Luis, Paco, Mayra, Claudia, Alaska, Sergio y Andrea por todo lo que me han enseñado en el laboratorio y de la vida, por consolarme, compartir gustos, los buenos momentos y risas

Gracias.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fué apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con apoyo de la convocatoria Ciencia Básica (255317) para Alberto Camacho y con 855559, para QCB. Gabriela.

## **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; así como en 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.

## Índice

<b>CAPITULO 1</b> .....	16
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	16
<b>CAPITULO 2</b> .....	19
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	19
<b>2.1 La obesidad, un problema de salud mundial</b> .....	19
<b>2.1.1 La obesidad puede considerarse un estado de comportamiento motivante hacia la ingesta de alimentos hipercalóricos</b> .....	20
<b>2.2 Adicción</b> .....	20
<b>2.2.1 Etiología de la adicción</b> .....	21
<b>2.2.2 Circuito de la recompensa</b> .....	21
<b>2.2.3 Adicción a la comida</b> .....	24
<b>2.3 Dietas Calóricas y activación de sistema inmune</b> .....	25
<b>2.4 Obesidad e Inflamación</b> .....	26
<b>2.4.1 Papel de la inflamación en el desarrollo de adicción</b> .....	27
<b>2.4.2 La microglia regula el perfil inflamatorio cerebral</b> .....	28
<b>2.5. Epigenética</b> .....	30
<b>2.5.1 Epigenética y adicción</b> .....	32
<b>2.6. Mecanismos epigenéticos y su importancia en la transmisión del fenotipo adictivo..</b>	33
<b>2.7 Modulación farmacológica de la epigenética en la activación de la microglia</b> .....	36
<b>2.7.1 S-Adenosilmetionina</b> .....	38
<b>2.7.2 5-Azatidina</b> .....	40
<b>2.7.3 Ácido suberoilánidido hidroxámico (SAHA)</b> .....	43
<b>2.8 Metilación del ADN como un modulador de la activación de la microglia y adicción</b> .....	44
<b>2.9. Programación metabólica por nutrientes, inflamación y su efecto potencial en la transmisión de conducta semejante a la adicción en la descendencia</b> .....	47
<b>CAPITULO 3</b> .....	49
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	49
<b>CAPITULO 4</b> .....	50
<b>4 HIPÓTESIS:</b> .....	50
<b>CAPITULO 5</b> .....	51
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	51

<b>5.1 Objetivo General:</b> .....	51
<b>5.2 Objetivos Específicos:</b> .....	51
<b>CAPITULO 6</b> .....	52
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	52
<b>6.1 Material de Laboratorio</b> .....	52
<b>6.2 Estrategia Experimental</b> .....	54
<b>6.3 Metodología</b> .....	54
<b>6.3.1 Programación Fetal de la descendencia</b> .....	55
<b>6.3.2 Condicionamiento Operante:</b> .....	56
<b>6.3.3 Obtención y almacenamiento de muestras</b> .....	59
<b>6.3.4 Cultivo Celular y Mantenimiento de la línea celular</b> .....	59
<b>6.3.5 Conteo Celular con Azul de Tripano y Siembra en Placa</b> .....	60
<b>6.3.6 Ensayo MTT</b> .....	60
<b>6.3.7 Extracción RNA</b> .....	61
<b>6.3.8 Retro-transcripción</b> .....	61
<b>6.3.9 PCR Tiempo Real</b> .....	62
<b>6.3.10 Extracción de DNA y RNA</b> .....	63
<b>CAPITULO 7</b> .....	64
<b>7 Resultados</b> .....	64
<b>7.1 Evaluación de la modulación farmacológica del perfil de metilación/acetilación del ADN en la activación de la microglia</b> .....	64
<b>7.2 Expresión de genes proinflamatorios por PCR Tiempo real</b> .....	65
<b>CAPITULO 8</b> .....	79
<b>8 Discusión</b> .....	79
<b>CAPITULO 9</b> .....	85
<b>9 Conclusiones</b> .....	85
<b>CAPITULO 10</b> .....	86
<b>10 Referencias</b> .....	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1</b> EL CIRCUITO DE LA RECOMPENSA.....	22
<b>FIGURA 2</b> ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA. ....	29
<b>FIGURA 3</b> MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN DEL DNA. ....	31
<b>FIGURA 4.</b> MODULACIÓN DE LA PROGRAMACIÓN FETAL POR FACTORES IN Y EXTRA-ÚTERO.....	35
<b>FIGURA 5</b> LA METILACIÓN DEL ADN. ....	36
<b>FIGURA 6</b> METABOLISMO DE LA METIONINA. ....	39
<b>FIGURA 7</b> MECANISMO DE ACCIÓN DE LA 5-AZA.....	41
<b>FIGURA 8</b> LAS HISTONAS. ....	42
<b>FIGURA 9</b> GRUPOS EXPERIMENTALES EVALUADOS.....	55
<b>FIGURA 10</b> DESCRIPCIÓN GRÁFICA DE LOS COMPONENTES DE LA CAJA DE COMPORTAMIENTO OPERANTE. .....	56
<b>FIGURA 11.</b> ESQUEMA DE PROTOCOLO .....	57
<b>FIGURA 12</b> CLASIFICACIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES .....	58
<b>FIGURA 13</b> RESULTADOS DE MTT.....	65
<b>FIGURA 14:</b> EXPRESIÓN GÉNICA .....	66
<b>FIGURA 15:</b> EXPRESIÓN GÉNICA CON ESTIMULACIÓN CON 100 mM PAL. ....	69
<b>FIGURA 16:</b> GRÁFICA DE PASTEL DE LOS PORCENTAJES DE HEMBRAS F0 (MADRES) ADICTAS Y NO ADICTAS, EXPUESTAS A DIETA CONTROL. ....	70
<b>FIGURA 17</b> GRÁFICA DE BARRAS DEL COMPORTAMIENTO OPERANTE HACIA LA DIETA HIPERCALÓRICA ENTRE HEMBRAS (ADICTAS Y NO ADICTAS) .....	71
<b>FIGURA 18:</b> GRÁFICA DE PASTEL DE LOS PORCENTAJES DE MACHOS F1 ADICTAS Y NO ADICTAS, EXPUESTAS A DIETA CONTROL.....	71
<b>FIGURA 19:</b> GRÁFICA DE PASTEL DE LOS PORCENTAJES DE MACHOS F1 (NO ADICTAS Y ADICTAS) PROVENIENTES DE MADRES ADICTAS, EXPUESTAS A DIETA CONTROL.....	72
<b>FIGURA 20:</b> GRÁFICA DE PASTEL DE LOS PORCENTAJES DE HEMBRAS F0 (MADRES) ADICTAS Y NO ADICTAS, EXPUESTAS A DIETA CAFETERÍA SUPLEMENTADA CON DONADORES METILO.....	73
<b>FIGURA 21:</b> GRÁFICA DE BARRAS DEL COMPORTAMIENTO OPERANTE HACIA LA DIETA HIPERCALÓRICA ENTRE HEMBRAS (ADICTAS Y NO ADICTAS), EXPUESTAS A DIETA CONTROL Y CAFETERÍA .....	74
<b>FIGURA 22:</b> GRÁFICA DE PASTEL DE LOS PORCENTAJES DE HEMBRAS F0 (MADRES) ADICTAS Y NO ADICTAS, EXPUESTAS A DIETA CAFETERÍA SUPLEMENTADA CON DONADORES METILO.....	75
<b>FIGURA 23:</b> GRÁFICA DE BARRAS DEL NÚMERO DE EVENTOS DE LA DESCENDENCIA CLASIFICADAS: ADICTAS Y NO ADICTAS .....	75
<b>FIGURA 24:</b> COMPORTEAMIENTO DE LA DESCENDENCIA.....	77
<b>FIGURA 25:</b> GRÁFICA DE BARRAS DEL NÚMERO DE EVENTOS ENTRE DESCENDENCIA CLASIFICADAS COMO A: ADICTAS Y NÁ: NO ADICTAS.....	78

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1. MATERIAL .....</b>	<b>52</b>
<b>TABLA 2. REACTIVOS .....</b>	<b>52</b>
<b>TABLA 3. EQUIPOS.....</b>	<b>53</b>

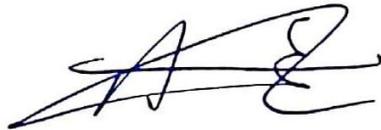
## NOMENCLATURA

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>AMPA</b>	a-amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>cm</b>	Centímetro
<b>FR1</b>	Fixed-ratio 1
<b>FR5</b>	Fixed-ratio 5
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>Kcal</b>	Kilo calorías
<b>mg</b>	Miligramos
<b>Min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro cúbico
<b>ms</b>	Milisegundos
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NMDA</b>	ácido N-metil-D-aspartico
<b>PFC</b>	Corteza prefrontal
<b>PR</b>	Progresive ratio
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>VTA</b>	Área tegmental ventral

## RESUMEN

La obesidad materna o la exposición a dietas calóricas durante los períodos pregestacionales y gestacionales promueven alteraciones en el metabolismo y la inmunidad de la descendencia a largo plazo. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el impacto del consumo excesivo de alimentos calóricos en la descendencia como un componente importante en el desarrollo de trastornos conductuales relacionados con alteraciones en la motivación por recompensas. Además, tampoco se conocen los mecanismos moleculares vinculados a modular el efecto de la nutrición sobre la modulación conductual, que incluyen a la epigenética. En esta tesis probamos la hipótesis de que el consumo de alimento hipercalórico de madres durante el embarazo y lactancia altera la motivación en la descendencia, y si estos cambios se correlacionan con modificaciones epigenéticas específicas de la microglia en genes proinflamatorios. Para abordar nuestra hipótesis, empleamos un modelo *in vitro* de células de microglia expuesto a inductores metabólicos de la respuesta inflamatoria y si ésta se modula farmacológicamente por agentes epigenéticos. Además, usamos un modelo *in vivo* de ratas Wistar hembra expuestas a dieta de cafetería durante 9 semanas que incluye: antes, durante y después del embarazo, protocolo conocido como programación fetal; y analizamos si la programación fetal induce cambios en la motivación de la descendencia empleando Condicionamiento Operante (protocolos FR1, FR5 y PR en la caja de Skinner). Finalmente, para demostrar la existencia de un mecanismo epigenético en la modulación conductual de la descendencia, expusimos a la descendencia a dieta rica en donadores de grupos metilo, ácido fólico, betaína, vitamina B12 y colina y analizamos su motivación por prueba de Condicionamiento Operante. Los resultados nos indican que los genes involucrados en la activación inflamatoria de la microglia en el cerebro (IL-6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$ , IFIT1) pueden ser modulados epigenéticamente utilizando inhibidores de enzimas encargados en metilación y acetilación y que se correlacionan con el aumento antes observado de marcadores de activación glial como IFIT1 y por lo tanto, modificar el comportamiento. Además, la

programación fetal con dieta hipercalórica aumenta la susceptibilidad de descendencia a presentar comportamiento adictivo, ya que se encontró que el grupo con dieta de cafetería tenía mayor número de eventos en los protocolos evaluados que utilizando una dieta suplementada con donadores de metilos, es posible modificar el metiloma e inducir cambios en la conducta de la descendencia, disminuyendo comportamiento adictivo.



---

## ABSTRACT

Maternal obesity or exposure to caloric diets during the pre-gestational and gestational periods promote alterations in the metabolism of offspring in the long term. However, little has been studied about the impact of excessive consumption of caloric foods in offspring and behavioral disorders related to alterations in the motivation for rewards and regulatory mechanisms of this, such as epigenetics. In this thesis we tested the hypothesis that the consumption of caloric food of mothers during pregnancy and lactation alters the motivation in the offspring, and if these changes are correlated with specific epigenetic modifications of the microglia in proinflammatory genes. We used microglia cell culture analysis exposed to epigenetic pharmacological modulators and stimuli that induce the inflammatory response and, as an in vivo model, female Wistar rats exposed to a 9-week diet that includes: before, during and after pregnancy, a protocol known as fetal programming. We analyzed whether fetal programming induces changes in offspring motivation using Operant Conditioning (protocols FR1, FR5 and PR in the Skinner box). The results indicate that the genes involved in the activation of microglia in the brain can be modulated epigenetically and that they correlate with the previously observed increase in glial activation markers such as IFIT1 and this modify behavior, in addition to fetal programming with hypercaloric diet increases the susceptibility of the offspring to present addictive behavior and that using a diet supplemented with methyl donors, it is possible to modify the methylome and induce changes in the behavior of the offspring.

# CAPITULO 1

## I. INTRODUCCIÓN

La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa, en gran parte asociada con un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas (WHO, 2017). La presencia de obesidad incrementa la susceptibilidad para el desarrollo de patologías metabólicas que incluyen en parte a la diabetes tipo 2 y cardiovasculares, entra otras (WHO, 2017). El consumo frecuente y excesivo de alimentos hipercalóricos o de alto contenido energético, es uno de los factores más importantes que contribuyen al desarrollo de la obesidad. La incapacidad de los sujetos con obesidad para controlar la ingesta excesiva de comida hipercalórica, sugiere la existencia de un comportamiento adictivo o de recompensa, similar al observado en el abuso de drogas (Kenny, 2011; Land & DiLeone, 2012). De interés, tanto la conducta compulsiva para la búsqueda de comida hipercalórica como la mostrada durante la búsqueda de drogas se registran en un circuito cerebral conocido como el circuito de la recompensa. Este circuito se compone principalmente de regiones cerebrales selectivas que incluyen el área ventral tegmental (AVT), la amígdala, la corteza prefrontal (CPF) y el núcleo accumbens (NAc) (N. D. Volkow, Wang, Tomasi, & Baler, 2013). Con ello, la preferencia para la obtención de la recompensa, ya sea alimento calórico o drogas, se vuelve exagerada en relación con otras recompensas de tipo natural (N. D. Volkow et al., 2013).

Estudios de los últimos años han confirmado ampliamente que el establecimiento de la adicción se asocia a un proceso de neuroplasticidad cerebral en las regiones del circuito de la recompensa, que implica cambios inducidos por el uso crónico del estímulo recompensante, generalmente identificado durante el abuso de drogas (Ersche, Jones, Williams, Robbins, & Bullmore, 2013). Actualmente, diversas investigaciones han identificado que la región del NAc representa una región clave implicada en los procesos preferenciales-adictivos hacia la comida apetecible e

hipercalórica que conducen a la obesidad (Gutiérrez-Martos et al., 2018). De interés, con evidencia reciente, empleando modelos animales de obesidad inducida por dieta (DIO), se ha propuesto que la presencia de un estado positivo de energía se asocia al desarrollo de conductas motivantes. En este contexto, nuestro grupo de investigación, y algunos otros alrededor del mundo, han reportado que dichos cambios son también promovidos durante la exposición de dieta grasa durante el desarrollo embrionario, y son capaces de transmitirse a la descendencia en edades tempranas de la vida (Camacho, 2017; Edlow, 2017). Este proceso fisiológico, identificado hace algunas décadas, se conoce como programación fetal de la descendencia, en el cual, se propone que estímulos ambientales o externos durante el embarazo son capaces de modular el desarrollo embrionario del sujeto y programar negativa o positivamente la fisiología de la descendencia.

Lo anterior sugiere que el entorno nutricional materno desempeña un papel clave en la programación de la salud en la descendencia, sugiriendo que la exposición a una dieta alta en grasa predispone a alteraciones en el sistema nervioso. De importancia, se sabe que la exposición a dieta alta en grasa en el contexto de obesidad promueve un estado de inflamación sistémica de tipo crónico (Claycombe, Brisette, & Ghribi, 2015; Dong, Zheng, Ford, Nathanielsz, & Ren, 2013). Nuestro laboratorio ha identificado que la descendencia de madres expuestas a dieta calórica durante el embarazo muestra la activación génica de marcadores inflamatorios en el NAc (tesis de maestría de MC. Larisa Montalvo Martinez). Se propone que estos cambios pueden estar asociados con la activación de mecanismos epigenéticos durante el desarrollo embrionario fomentando cambios a largo plazo asociados al fenotipo adictivo en etapas tempranas de la vida (Walker & Nestler, 2018). En este contexto, muy pocos estudios han identificado los nutrientes selectivos capaces de inducir modulaciones epigenéticas asociadas a la activación de un perfil pro inflamatorio durante el desarrollo embrionario, y su efecto en el desarrollo de conducta semejante a adicción en la descendencia (Claycombe et al., 2015), fundamentando la prioridad de la investigación con potencial de aplicación traslacional.

En esta tesis caracterizamos el efecto de la programación fetal por ingesta de dieta calórica en el desarrollo de conducta semejante a adicción a la comida en la descendencia y su modulación por promotores farmacológicos de la metilación de genes proinflamatorios.

## CAPITULO 2

### II. ANTECEDENTES

#### 2.1 La obesidad, un problema de salud mundial.

El sobrepeso y la obesidad se definen como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede perjudicar la salud. La clasificación de sobrepeso y obesidad en adultos involucra el índice de masa corporal (IMC), que se define como el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de su altura en metros ( $\text{kg} / \text{m}^2$ ) (WHO, 2017). La organización mundial de la salud define como sobrepeso a sujetos que presentan un IMC mayor o igual a 25 y con obesidad un IMC mayor o igual a 30. La presencia de un IMC elevado se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades crónicas que incluyen a la falla al miocardio, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad hepática, hiperlipidemia y ciertos tipos de cáncer. En general, alrededor del 13% de la población adulta del mundo (el 11% de los hombres y el 15% de las mujeres) presentaban obesidad en el 2016 y la prevalencia mundial de la obesidad casi se triplicó entre 1975 y 2016. En México, más del 70% de la población adulta de edades entre los 30 y 60 años muestra un fenotipo obeso (Arroyo & Herron, 2013; Dávila-Torres, González-Izquierdo, & Barrera-Cruz, 2015). Si las tendencias continúan, para el año 2030 se estima que el 38% de la población adulta mundial tendrá sobrepeso y otro 20% será obeso (Arroyo & Herron, 2013; Kelly, Yang, Chen, Reynolds, & He, 2008). La obesidad tiene orígenes multifactoriales, sin embargo, de manera simple, el aumento de peso se relaciona con un incremento en el consumo calórico que supera el gasto metabólico del cuerpo. Se propone que el aumento en el consumo de alimento es en parte asociado, pero no limitado, a cambios en la preferencia de comida calórica, y que además se incluyen diversas variables como el género, aspectos socioculturales y geográficos de la población (E. P. Williams, Mesidor, Winters, Dubbert, & Wyatt, 2015).

### **2.1.1 La obesidad puede considerarse un estado de comportamiento motivante hacia la ingesta de alimentos hipercalóricos**

Datos experimentales empleando modelos animales y en cohortes de humanos han demostrado que la exposición repetida a comida con alto contenido de grasa y/o azúcar, modula negativamente la integración neuronal induciendo defectos en los mecanismos de saciedad involucrados en el control de la ingesta de comida (Avena, Rada, & Hoebel, 2008). Lo anterior promueve la incapacidad de los individuos con obesidad para controlar la ingesta de comida hipercalórica (Kenny, 2011; Land & DiLeone, 2012)). Por otra parte, diversas investigaciones han identificado una correlación conductual entre la adicción a drogas y la ingesta descontrolada de alimentos. Por ejemplo, en ambos casos, existe una pérdida del control sobre el consumo del estímulo (droga o comida hipercalórica) y muestran un uso continuo del estímulo a pesar de las consecuencias negativas que implica su ingesta. Por ejemplo, los individuos muestran mayor tiempo invertido en el consumo y la búsqueda del estímulo con respecto a otras actividades; y preserva un deseo intenso por obtener la recompensa (estímulo satisfactorio generado por la droga o la comida hipercalórica),(Kenny, 2011; N. D. Volkow et al., 2013; Nora D. Volkow & Wise, 2005). Con base en lo anterior, se ha propuesto a la comida hipercalórica como un elemento adictivo, capaz de generar adicción en el humano. En las siguientes secciones definiremos las bases neurobiológicas de la adicción y su importancia en la ingesta de comida.

## **2.2 Adicción**

La adicción se define como un trastorno crónico recurrente caracterizado por (1) compulsión para buscar y tomar el estímulo, (2) pérdida de control para limitar el consumo y (3) el surgimiento de un estado emocional negativo (p. Ej., Disforia, ansiedad e irritabilidad) que refleja un síndrome de abstinencia motivacional cuando se limita el consumo (Hebebranda et al., 2014; Koob, 2013). Por otra parte, en el 2013, el “National Institute on Drug Abuse”, por sus siglas en inglés, definió a la adicción como una enfermedad neurológica crónica, caracterizada por un uso compulsivo y

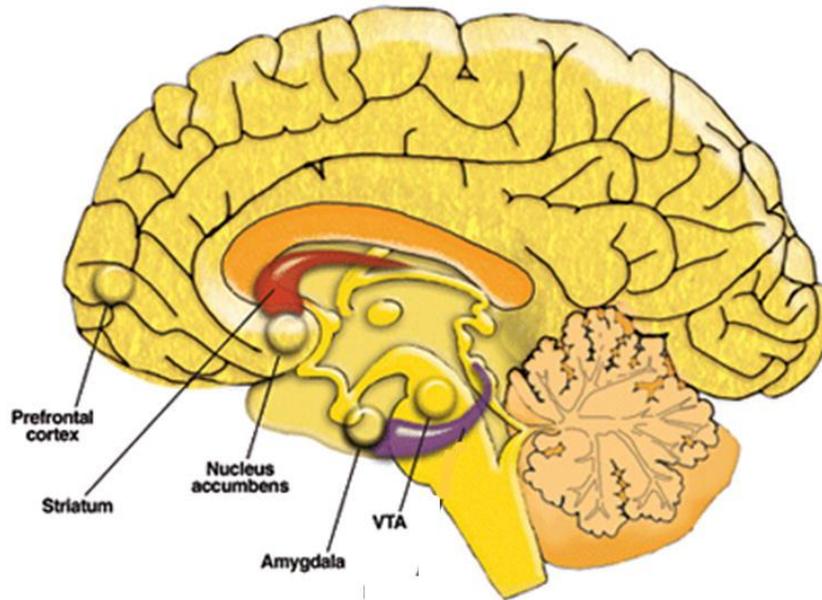
búsqueda del estímulo, a sabiendas de sus posibles consecuencias negativas que presenta el individuo.

### **2.2.1 Etiología de la adicción**

Gran parte del conocimiento fisiológico de los fenómenos adictivos proviene de investigación en la adicción a las drogas, por lo que en esta sección comentaremos los fundamentos científicos más sobresalientes para explicar el desarrollo de la adicción. La adicción presenta la integración de vías o mecanismos neurobiológicos multifactoriales, que incluyen en su mayoría factores externos, factores genéticos y epigenéticos, que tienen el potencial de modular los cambios a largo plazo asociados al fenotipo adictivo a nivel del circuito de la recompensa (Walker & Nestler, 2018).

### **2.2.2 Circuito de la recompensa**

El sistema de la recompensa integra a regiones del sistema nervioso central que obedecen a estímulos específicos y naturales. La activación de estas regiones regula los neurotransmisores que permiten al individuo desarrollar conductas aprendidas que responden a acciones placenteras o de rechazo. El NAc, el hipocampo, la mPFC, la amígdala y el VTA, son los núcleos o áreas cerebrales más importantes de este circuito (Forbes & Dahl, 2012). Estas regiones son principalmente las que integran las vías de neurotransmisión dopaminérgica y han sido implicadas tanto en el dolor crónico como en el procesamiento emocional. En particular, las sustancias adictivas pueden alterar la plasticidad sináptica en diversas regiones del circuito que incluyen al mPFC, el NAc y el VTA (Kai et al., 2018; Ulloque & Ulloque, 1999).



**Figura 1** El circuito de la recompensa. El sistema de recompensa del cerebro integra a las estructuras que incluyen el AVT, cuerpo estriado ventral (NAc), el cuerpo estriado dorsal (el núcleo caudado y putamen), sustancia nigra (la pars compacta y pars reticulata), la PFC, córtex cingulado anterior, córtex insular, hipocampo, hipotálamo (particularmente, el núcleo orexinérgico en el hipotálamo lateral), tálamo, núcleo subtalámico, amígdala, que en su conjunto se encargan de reforzar las experiencias y estímulos externos placenteros. La respuesta subsecuente a estos estímulos se asocia al reclutamiento de regiones accesorias que se vinculan a la memoria y en la toma de decisiones complejas, muchas de ellas implicadas en el desarrollo de trastornos de sustancias de abuso (Forbes & Dahl, 2012).

La comprensión general del circuito de recompensa subyacente a la adicción se integra inicialmente en el VTA, una región cerebral heterogénea compuesta en gran parte por neuronas dopaminérgicas (DA) (60–65%) y ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA; ~ 30–35%), con una proporción menor de Neuronas glutamatérgicas (2-3%)(Nair-Roberts et al., 2008). La mayoría de los estudios se han centrado en las neuronas VTA DA, ya que se sabe que la estimulación de estas neuronas y la liberación de DA en los sitios de proyección, sobre todo a nivel del NAc, promueven la búsqueda de la recompensa (Cooper, Robison, & Mazei-Robison, 2017). El sistema de dopamina se comprende de neuronas dopaminérgicas en VTA que se proyectan hacia el NAc y neuronas en la sustancia nigra (SN), las cuales se asocian a la formación de hábitos, acciones motivantes y reforzamiento del aprendizaje (Nora D. Volkow, Wise, & Baler,

2017; Yager, Garcia, Wunsch, & Ferguson, 2015). La información sobre las propiedades sensoriales de los alimentos que impulsan la ingesta motivada se transmite desde las cortezas prefrontal y orbitofrontal a través del NAc al área hipotalámica lateral (LHA) y VTA, regiones críticas en el sistema de dopamina mesolímbico (Rinaman, 2010; Zeltser, 2018). De manera importante, la actividad de las neuronas DA en el VTA se relaciona con la activación subsecuente a nivel del NAc, en donde la DA puede ejercer sus efectos a través de la activación de los receptores dopaminérgicos ubicados en neuronas espinosas medias (MSN) del NAc. Las MSN son neuronas de proyección GABAérgicas y consisten en su mayoría por 2 clases separadas, definidas por su expresión de receptores, neuronas de DA tipo D1 o D2 (Gerfen & Surmeier, 2011).

Además de la heterogeneidad celular (células D1 y D2), también existe una heterogeneidad regional, con distintos comportamientos asociados a fármacos y diferencias de plasticidad observadas entre el núcleo de NAc y las subregiones de la región Shell (Saddoris, Sugam, Cacciapaglia, & Carelli, 2013). Por ejemplo, las MSN del NAc parecen ser críticos para asignar un valor motivacional a estímulos discretos asociados con la recompensa o aversión, y particularmente actualizar estos valores a medida que cambian las circunstancias, mientras que aquellos en el NAc-Shell conducen las respuestas a la exposición repetida a experiencias gratificantes, como la administración crónica de droga (Cooper et al., 2017; Meredith, Baldo, Andrezjewski, & Kelley, 2008). Cada vez más evidencia ha demostrado que los mecanismos neurobiológicos identificados en la búsqueda de drogas y en la búsqueda de alimentos se relacionan en parte con neuroadaptaciones en el sistema de dopamina (DA) (Nora D. Volkow et al., 2017), lo cual abordaremos a continuación.

Selectivamente, el cuerpo estriado dorsal (DS) y el NAc quizá sean los centros de control de excelencia en la motivación para la búsqueda de las recompensas. Por ejemplo, el DS juega un papel importante en los comportamientos de toma de decisiones, particularmente en acciones dirigidas a objetivos y selección de acciones basadas en el valor de recompensa esperado. Por su parte, el NAc participa en el aprendizaje motivacional para adquirir la recompensa. El NAc está dividido en dos

subregiones neuroanatómicas y funcionalmente distintas llamadas NAc Shell y NAc Core (Gangarossa et al., 2013; Gutiérrez-Martos et al., 2018; Smith, Rigney, & Delgado, 2016). El NAc y el VTA son componentes centrales del circuito subyacente recompensa y memoria de recompensa. Como se mencionó anteriormente, la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el VTA parece estar vinculada a la predicción de la recompensa. La NAc está involucrado en el aprendizaje asociado con el refuerzo y la modulación de las respuestas motoras a los estímulos que satisfacen las necesidades homeostáticas internas. El NAc Shell parece ser particularmente importante para las acciones iniciales de la droga dentro del circuito de recompensa, las recompensas adictivas parecen tener un mayor efecto sobre la liberación de dopamina en la región Shell que la región Core, que se encarga del procesamiento cognitivo de la función motora relacionada con la recompensa y el refuerzo, y la regulación del sueño de onda lenta. (Hyman, Malenka, Nestler, Sydor, & Brown, 2009)

### **2.2.3 Adicción a la comida**

Se estima que la prevalencia general de adicción a la comida en la población adulta está entre el 5.4 y el 25.7% (Canadá y EE. UU, respectivamente), y en una muestra canadiense se observó que ocurría en el 6,7% de las mujeres y el 3% de los hombres en la población general (Pedram et al., 2013). En las mujeres, la adicción a la comida parece ser más prevalente entre los 45 - 61 años y es más común en las mujeres entre los 45 - 49 años con un IMC > 35. Esto puede estar asociado con cambios perimenopáusicos en las hormonas sexuales femeninas, que se ha demostrado que alteran la ingesta de alimentos, aunque se requieren investigaciones adicionales que confirmen esta propuesta. Se estima que aproximadamente el 15-25% de los pacientes obesos cumplen con los criterios para la adicción a la comida. Sin embargo, cabe señalar que ambos estudios carecen de un número suficiente de casos, por lo que la población representativa del fenotipo adictivo en el humano está subestimado (Gearhardt et al., 2012; Leigh & Morris, 2018).

Etiquetar un alimento o nutriente como "adictivo" implica que contiene moléculas y/o posee una propiedad inherente con la capacidad de hacer que los individuos susceptibles sean adictos a ella, como es el caso de las sustancias químicas de abuso. Ciertos alimentos tienen propiedades gratificantes y reforzantes; por ejemplo, las combinaciones de alto contenido de azúcar y grasa son gratificantes para los roedores y los humanos por igual (Hebebranda et al., 2014). Desde una perspectiva evolutiva, estas propiedades gratificantes aumentan la motivación para buscar y obtener un suministro de energía adecuado y nutricionalmente diverso. En este contexto, nuestro entorno obesogénico moderno, que se caracteriza por la disponibilidad de alimentos altamente apetecibles y energéticamente ricos, presentan propiedades gratificantes que pueden desintegrar los mecanismos homeostáticos del control de energía a nivel de los núcleos del hipotálamo y del circuito de la recompensa, y conducir a la ingesta descontrolada de alimento calórico y al aumento de peso. Algunos autores han propuesto que el reciente aumento en la prevalencia de la obesidad refleja la aparición de la "adicción a la comida" en un porcentaje significativo de la población (Hebebranda et al., 2014).

### **2.3 Dietas Calóricas y activación de sistema inmune**

Una de las características de la obesidad por consumo crónico de alimentos hipercalóricos es la presencia de metainflamación, una inflamación sistémica y estéril atípica. Este estado inflamatorio implica la participación de los sistemas inmunitarios innatos y adaptativos, lo que resulta en la producción de citocinas, quimiocinas y lípidos inflamatorios. La metainflamación se ha detectado en una variedad de tejidos diferentes, incluidas diferentes áreas del cerebro. Está bien establecido que una dieta alta en grasa induce rápidamente una inflamación hipotalámica, con un aumento asociado en la expresión de genes inflamatorios y la gliosis. Curiosamente, la inflamación hipotalámica temprana puede observarse semanas antes de la expansión e inflamación del tejido adiposo, lo que sugiere que la señalización inflamatoria

hipotalámica contribuye a la génesis del fenotipo obeso, y no es simplemente una consecuencia de la inflamación periférica (Macedo, Souza, Glezer, & Gaspar, 2019).

Comprender cómo esta dieta desencadena la inflamación e identificar por qué las células inmunitarias innatas en el hipotálamo responden de manera diferente es esencial para combatir la obesidad.

## **2.4 Obesidad e Inflamación**

Se sabe que la ingesta de comida hipercalórica y un estado positivo de energía, como la obesidad, inducen un estado de inflamación crónica de bajo grado a través de una mayor secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , en parte promovido por la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo. La obesidad, al igual que otras enfermedades crónicas, posee múltiples orígenes con gran variedad de comorbilidades. Evidencia reciente muestra que la obesidad comparte características con otras patologías como la inflamación crónica de bajo grado que acentúa la enfermedad y se asocia con múltiples complicaciones (Izaola, de Luis, Sajoux, Domingo, & Vidal, 2015). La neuroinflamación está relacionada independientemente con la alteración cognitiva (Bilbo & Tsang, 2010; McNaul, Todd, McGuinness, & Passmore, 2010). La inflamación ha surgido como un factor importante en los trastornos del comportamiento. Los pacientes que presentan trastornos del comportamiento muestran niveles plasmáticos elevados de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , así como un aumento de la expresión de marcadores inflamatorios en las células sanguíneas (Mechawar & Savitz, 2016). El aumento del consumo de dieta alta en grasas se relaciona con el comportamiento depresivo y los trastornos emocionales en ratones (Arcego et al., 2018; H. Wang, Zhou, Liu, Wang, & Shang, 2017) y la neuroinflamación podría ser un modulador importante de estas alteraciones de comportamiento. El ácido palmítico abolió la migración y la actividad fagocítica de la microglía en respuesta al interferón- $\gamma$ , afectando así la respuesta protectora de estas células después de un ataque inflamatorio in vitro (Yanguas-Casás et al., 2018). El análisis post mortem del tejido cerebral de pacientes con TDM indicó un aumento del

6,5% en ácido palmítico y una disminución del 6,2% en el ácido oleico en la amígdala, en comparación con los controles (Hamazaki et al., 2015), lo que sugiere que los niveles alterados de los ácidos grasos pueden estar implicados en la disfunción cerebral. Sin embargo, aún existe la falta de evidencia científica que vincule a la inflamación periférica en la obesidad con la modulación de la función cognitiva y la relacionada con la susceptibilidad a la adicción (Bilbo & Tsang, 2010).

#### **2.4.1 Papel de la inflamación en el desarrollo de adicción**

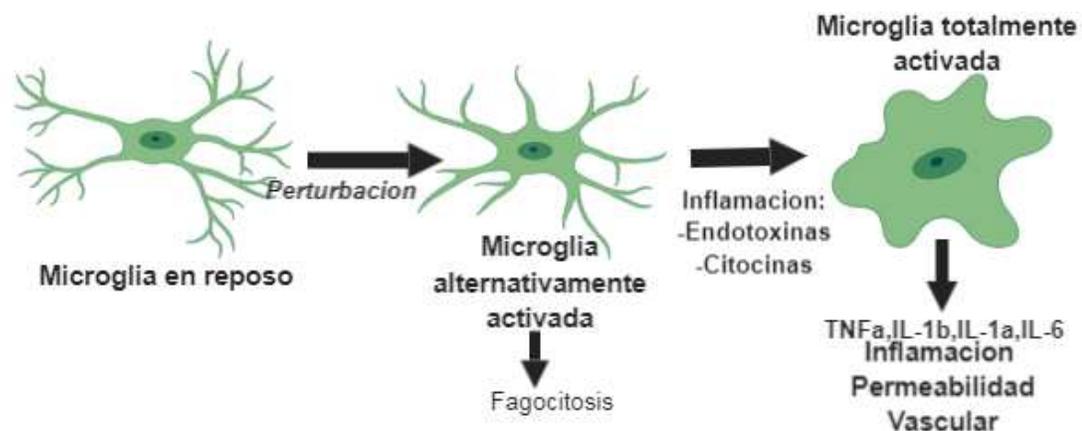
A la fecha, el vínculo entre inflamación y adicción no ha sido completamente definido, sin embargo, muchas investigaciones han identificado el papel del NFκB en la neurotoxicidad e inflamación inducida por abuso de sustancias, en especial del alcohol. El aumento de los ácidos grasos saturados, observado en los modelos de obesidad y alto consumo de grasa, tiene un potencial proinflamatorio intrínseco que afecta las funciones celulares importantes. Los ácidos grasos pueden activar la señalización del receptor 4 tipo a Toll (TLR4) en los adipocitos y macrófagos e inducir la señalización inflamatoria (H. Shi et al., 2006), además que influyen directamente en la inflamación inducida por el alcohol, la neurotoxicidad y algunos efectos conductuales (Alfonso-Loeches, Pascual-Lucas, Blanco, Sanchez-Vera, & Guerri, 2010; Nennig & Schank, 2017; Pascual, Baliño, Alfonso-Loeches, Aragón, & Guerri, 2011; Wu et al., 2012). Los TLR son una familia de receptores transmembrana tipo I que reconocen una variedad de patrones moleculares asociados a peligros microbianos (DAMP) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y orquestan una respuesta de señalización intracelular, desempeñando un papel importante en los trastornos infecciosos e inflamatorios. Entre al menos 13 miembros de los TLR descritos en mamíferos, TLR2 y TLR4 se caracterizan mejor por su participación en la respuesta inmune (Fessler, Rudel, & Brown, 2009) El TLR4 desempeña un papel crítico en el sistema inmunitario innato al activar las vías de señalización proinflamatoria dependientes de MyD88 e independientes de MyD88, así como la respuesta NFκB (Melo, Santos, & Ferreira, 2019) La activación de TLR4 regula la producción de

citocinas y mediadores proinflamatorios, respuesta neuroinmune, en gran parte debido a su íntimo inductor de la activación de NFkB inducida por etanol (Nennig & Schank, 2017). Si bien se ha reconocido que la exposición crónica a drogas de abuso activa NFkB, la evidencia más reciente muestra que NFkB se implica en las propiedades gratificantes de las drogas de abuso. Por ejemplo, la inhibición de NFkB en el NAc atenúa el desarrollo de la preferencia de lugar condicionada por morfina en ratas (Nennig & Schank, 2017; X. Zhang et al., 2011). Por su parte no existen datos del papel de la inflamación y sus efectores en la regulación de la adicción a la comida.

#### **2.4.2 La microglia regula el perfil inflamatorio cerebral**

De manera general, a nivel cerebral la microglia representa a células inmunes residentes, que simulan a los macrófagos del sistema periférico, que modulan el nivel de inflamación central. Estadísticamente, la microglia incluye aproximadamente del 5 - 12% del total de células del SNC en el cerebro sano y la médula espinal. La microglia se deriva de las células precursoras mieloides que provienen del saco vitelino embrionario y que viajan al área del SNC en desarrollo durante la embriogénesis temprana. Los progenitores microgliales se encuentran presentes alrededor del tubo neural en el día 9 embrionario en ratones, y desde la quinta semana de gestación en humanos. Después de la entrada neural, los progenitores de la microglia migran a través del tejido nervioso en desarrollo y experimentan una proliferación masiva antes de alcanzar su densidad final. La microglía embrionaria se convierte en microglía madura altamente ramificada a través de factores reguladores como Pu.1 (factor de transcripción para células mieloides), IL-34 y CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos). La microglia se distribuye ampliamente en todo el SNC, aunque la cantidad y la ubicación entre las especies varían. A pesar de su amplia distribución, las microglia representan una comunidad bastante heterogénea con diferentes subpoblaciones basadas en regiones específicas del cerebro. Cada subpoblación de microglia desarrolla características únicas con capacidades y funciones específicas (Ginhoux, Lim, Hoeffel, Low, & Huber, 2013; Hoeffel & Ginhoux, 2018; Szepesi, Manouchehrian, Bachiller, & Deierborg, 2018)

Fenotípicamente, la microglia ramificada se ha descrito como "inactiva" o permanece en un estado "de reposo". Sin embargo, estos puntos de vista cambiaron radicalmente después de que los estudios de imágenes in vivo revelaron la extraordinaria naturaleza activa de los procesos de microglia en el cerebro sano. Los procesos de la microglia están constantemente inquietos y se someten a ciclos continuos de extensión y retiro y de formación *de novo* para escanear su entorno en busca de alteraciones en la homeostasis cerebral, por lo que la microglia "en reposo" puede adquirir numerosos fenotipos (Szepesi et al., 2018).



**Figura 2** Activación de la Microglia. Durante las enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas, se promueve la activación de la microglía. Durante el proceso de activación se promueven cambios en el fenotipo morfológico, que incluyen aumento de la fagocitosis, expresión de marcadores de superficie y cambios en la expresión génica. La microglía completamente activada produce moléculas inflamatorias y tóxicas que contribuyen positivamente a la inflamación neuronal, la toxicidad neuronal y la disfunción vascular. Sin embargo, se sabe que, durante algunas enfermedades neurodegenerativas, la microglía asume un fenotipo de activación alternativo que coincide con la expresión de proteínas antiinflamatorias. Esta microglia puede desempeñar un papel adaptativo benéfico que minimiza la respuesta inflamatoria al daño neuronal (Abcouwer SF ,2018).

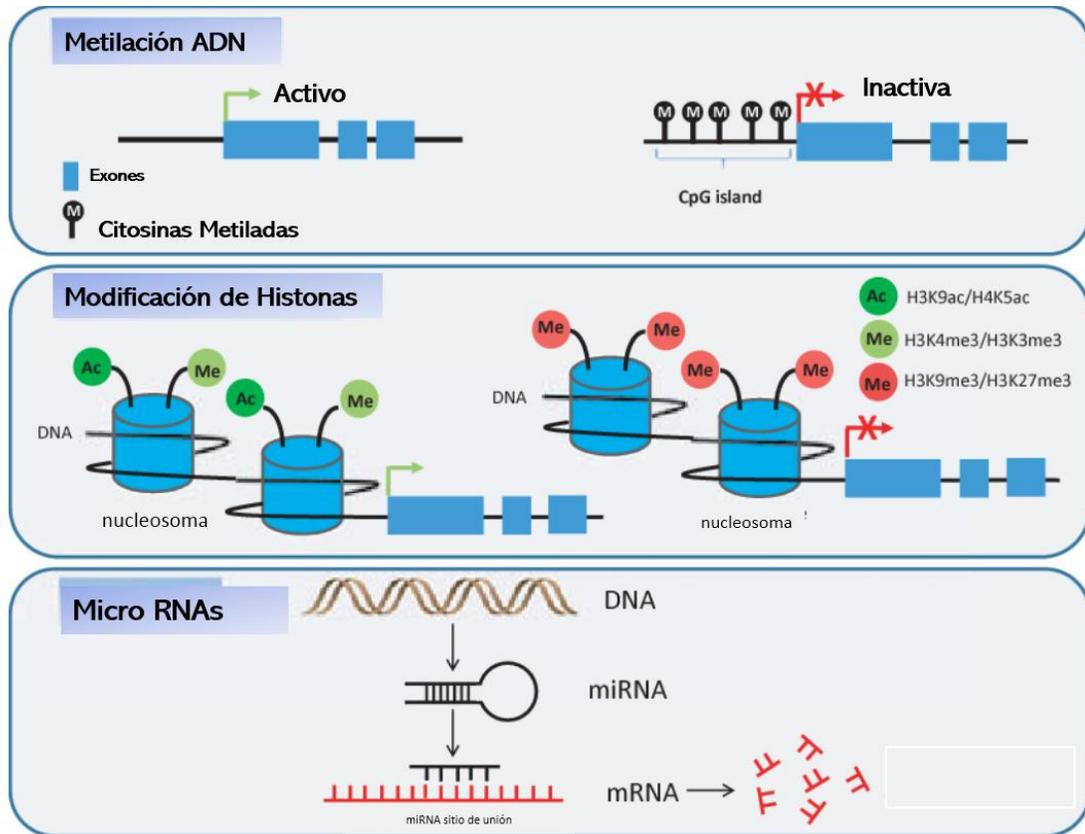
Cuando la microglía detecta señales de "peligro" que comprometen la homeostasis del SNC, por ejemplo, a través de receptores de reconocimiento de patógenos, la microglia cambia rápidamente su apariencia acortando los procesos celulares, agrandando su soma y transformándose en un fenotipo reactivo. En respuesta a estas señales, la microglía influye en las conexiones neuronales, modula las funciones de otras glías y media las respuestas inflamatorias a la enfermedad o lesión. En este

contexto, las células microgliales se activan rápidamente promoviendo la secreción de especies de oxígeno reactivo (ROS), óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) y una variedad de citocinas proinflamatorias, que incluyen interleucina II-1 $\beta$ , II-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Jung et al., 2015; Merson, Binder, & Kilpatrick, 2010). Aunque la activación microglial se considera un mecanismo de protección implicado en la eliminación de infección patógena y en la regulación de la reparación y recuperación tisular, la activación excesiva o persistente como respuesta inmune descontrolada estimula y aumenta la producción de mediadores proinflamatorios neurotóxicos y causa neuroinflamación y lesión neuronal (Jung et al., 2015).

Uno de los interrogantes más importantes en el tema de inflamación cerebral se relaciona a identificar si la activación de la microglia es causa de la generación de daño o neurodegeneración, y cómo ésta se modula por factores externos. Existe evidencia proponiendo que factores o estímulos externos pueden activar sistemas de modulación epigenética e inducir la activación de la microglía y sensibilizar al cerebro a la aparición de respuesta a una lesión crónica, infección o inflamación en el SNC.

## **2.5. Epigenética**

La epigenética se refiere a estados somáticamente hereditarios de expresión génica resultante de cambios en la estructura de la cromatina sin alteraciones en la secuencia de ADN (Lecoutre et al., 2017). Se sabe que el ADN mantiene la estabilidad durante todo el ciclo de vida (excepto las mutaciones que ocurren al azar), mientras que las marcas epigenéticas cambian drásticamente a lo largo de las primeras etapas de desarrollo para iniciar patrones de expresión tejido específico. Los principales mecanismos de regulación epigenética en mamíferos son la modificación covalente del ADN por metilación, modificaciones postraduccionales (que incluyen la acetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación) de las histonas, así como la regulación mediante ARN no codificantes (ARNc) (Vaiserman & Koliada, 2017).



**Figura 3** Mecanismos epigenéticos de regulación del DNA. La figura muestra algunos de los mecanismos epigenéticos implicados en la modificación de la estructura de la cromatina. La metilación del ADN induce la modificación covalente de los residuos de citosina en dinucleótidos CpG dentro de las secuencias de genes, y en la mayoría de los casos, conduce al silenciamiento de la transcripción. A diferencia de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas pueden llevar a la activación o la represión de la transcripción del gen, dependiendo de qué tipo de residuos se modifican y qué tipo de modificaciones se están llevando a cabo. Las colas N-terminales de las histonas pueden sufrir una variedad de modificaciones covalentes postraduccionales, incluidas la metilación y la acetilación. La regulación por los ARN no codificantes incluye a microARN (miARN) pequeños, de aproximadamente 22 nucleótidos, que regulan la expresión génica a través del silenciamiento postranscripcional de los genes diana. El emparejamiento de bases específico de la secuencia de miRNAs con 3'UTRs de RNA mensajeros da como resultado la degradación de la diana o la inhibición de la traducción (D'Addario, Di Francesco, Pucci, Finazzi Agrò, & MacCarrone, 2013).

### 2.5.1 Epigenética y adicción

La contribución de la epigenética en el desarrollo de adicción es un área de reciente y activa investigación. En principio, se ha identificado que cambios en las histonas y la cromatina están presentes durante la ingesta de drogas y/o sustancias adictivas (Biliński et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos epigenéticos implicados en el desarrollo de adicción a la comida parecen estar no completamente elucidados.

Se conoce que la adicción muestra una predisposición genética hereditaria que representa el 50% de susceptibilidad, sin embargo, la influencia de factores epigenéticos potenciales, como el ambiente, los hábitos, culturales y sociales, representan un gran número de este porcentaje (Biliński et al., 2012; Samochowiec, Mordasewicz, Arentowicz, & Samochowiec, 2005). Por ejemplo, los estudios de Kumar et al. 2005, demostraron que la manipulación farmacológica y genética de la Histona desacetilasa (HDAC) en el NAc, altera los niveles de acetilación de histonas *in vivo*, y la sensibilidad conductual a la cocaína (A. Kumar et al., 2005). Por su parte, las drogas pueden inducir alteraciones epigenéticas en genes selectivos. Por ejemplo, la metanfetamina conduce a la disminución en la acetilación total de lisina 18 y 9 en la histona H3 (H3K18ac y H3K9ac), mientras que induce el aumento en la acetilación de la lisina 5 y 8 en la histona H4 (H4K5ac y H4K8ac) en el NAc de rata (Martin et al., 2012). Sin embargo, la administración crónica de metanfetamina parece incrementar la acetilación de la histona H3 y disminuye la tri-metilación en la lisina 27 y 4 en la histona H3 (H3K27me3 y H3K4me3) en el NAc de ratones (Martin et al., 2012). Además, la exposición crónica de anfetamina aumenta significativamente la metilación global del ADN en el NAc de ratas Sprague-Dawley, que correlaciona con la regulación a la baja de genes como *Nefm*, *Nefl*, *Htr2a*, *Gabrg2* y *Hsd11b1* (Mychasiuk, Muhammad, Ilnytskyy, & Kolb, 2013). Por su parte, el éxtasis o MDMA aumenta la tri-metilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3) en los promotores de pronociceptina, prodinorfina y neuropsina en el NAc de la rata, mientras que disminuye la acetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9ac) en el promotor pN / OFQ (Caputi, Palmisano, Carboni, Candeletti, & Romualdi, 2016). Finalmente, la MDMA aguda causa aumento en H3K9ac y disminución concomitante en la dimetilación de la

lisina 9 en la histona H3 (H3K9me2) en el promotor de la prodinorfina (Caputi et al., 2016). Estas evidencias proponen que las drogas modulan negativa o positivamente la activación de genes selectivos implicados en la adicción a través de cambios en la metilación y/o acetilación de histonas y/o DNA.

## **2.6. Mecanismos epigenéticos y su importancia en la transmisión 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 pueden ser transmitidos a la descendencia a través de un mecanismo epigenético (Anway, Cupp, Uzumcu, & Skinner, 2005; Skinner, Manikkam, & Guerrero-Bosagna, 2011) (Bale et al., 2010; Conradt et al., 2018).

En este sentido, cambios ambientales que perturban la homeostasis de un individuo -incluyendo el estrés, los retos nutricionales, las infecciones, aspectos conductuales, hormonales, etc.- pueden tener efectos epigenéticos sobre el DNA del sujeto e influir en la expresión selectiva de genes que coordinan las funciones fisiológicas del mismo, un fenómeno fisiológico conocido como programación fetal. Este tipo de programación, puede tener consecuencias en la descendencia durante el desarrollo y perdurar en la edad adulta, provocando manifestaciones conductuales específicas, y que pueden transmitirse inclusive a generaciones posteriores sin el desencadenante causal inicial, a lo que se le conoce como Herencia epigenética transgeneracional (Bohacek & Mansuy, 2015; Skinner et al., 2011). Para el caso de su efecto a nivel del sistema nervioso, la programación fetal puede modular el desarrollo y maduración del cerebro y, por lo tanto, alterar su estructura original y establecer un nuevo proceso conocido como programación del fenotipo patológico (Bale, et al., 2010).

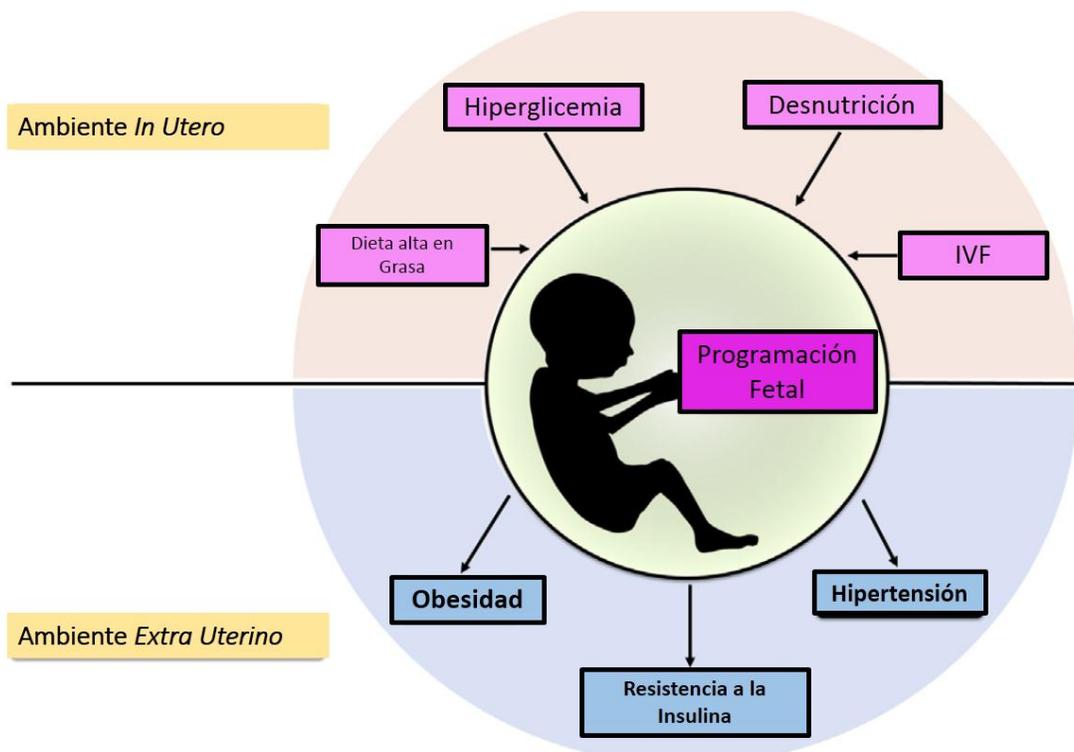
En este contexto, los hallazgos clínicos de la década de 1980 evidenciaron un mayor riesgo a presentar afecciones crónicas, como diabetes, enfermedad cardiovascular, dislipidemia e inclusive esquizofrenia, en individuos con bajo peso al nacer, lo que indica que el ambiente intrauterino puede correlacionarse con los resultados de salud a largo plazo. Este fenómeno puede atribuirse en parte a los "orígenes evolutivos de la enfermedad adulta", conocida como la hipótesis de Barker, en la que un individuo está programado para el ahorro nutricional durante la gestación y la vida posnatal temprana para sobrevivir a los insultos ambientales causados por una nutrición deficiente y recursos limitados (Block & El-Osta, 2017). Con ello, durante la programación fetal se inducen mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica y que pueden persistir durante un largo período de tiempo en la descendencia, induciendo fenotipos aberrantes o positivos en la salud (Kereliuk, Brawerman, & Dolinsky, 2017).

La programación metabólica del desarrollo no se restringe a la desnutrición, ya que estudios recientes también han implicado a la dieta baja en proteínas y alta en grasas de la madre como puntos clave de la salud futura de la descendencia (Vanhees, Vonhögen, Van Schooten, & Godschalk, 2014). Los resultados negativos de la exposición de la dieta alta en grasa materna en roedores experimentales y modelos de primates no humanos se relacionan con crecimiento fetal deficiente y eventos metabólicos adversos con predisposición a enfermedad metabólica, incluyendo disfunción hepática, desregulación tiroidea, resistencia a la insulina, presión arterial alta y aumento de la adiposidad (Lecoutre et al., 2017; L. Williams, Seki, Vuguin, & Charron, 2014).

A nivel molecular, la dieta alta en grasa materna murina causa una expresión disminuida de genes de adipocitoquinas mediada por la hipermetilación de ADN que conduce a hipertensión, resistencia a la insulina e hiperlipidemia en la descendencia (Masuyama & Hiramatsu, 2012; Masuyama, Mitsui, Eguchi, Tamada, & Hiramatsu, 2016). La alteración metabólica en este contexto se relaciona con la generación de síndrome metabólico y que incluye modificaciones epigenéticas en la expresión del gen de la adiponectina y la leptina, induciendo un fenotipo alterado transgeneracional

que se preserva durante tres generaciones a pesar de la posterior dieta materna normal en el útero(Masuyama, Mitsui, Nobumoto, & Hiramatsu, 2015). De interés, con respecto a la alteración metabólica se ha observado que a corto plazo una dieta con niveles de grasas normales antes del embarazo en ratones hembra pero sin pérdida de peso, no es útil y solo exagera la obesidad de las crías posiblemente a través de la expresión alterada de genes metabólicos (Fu et al., 2016)

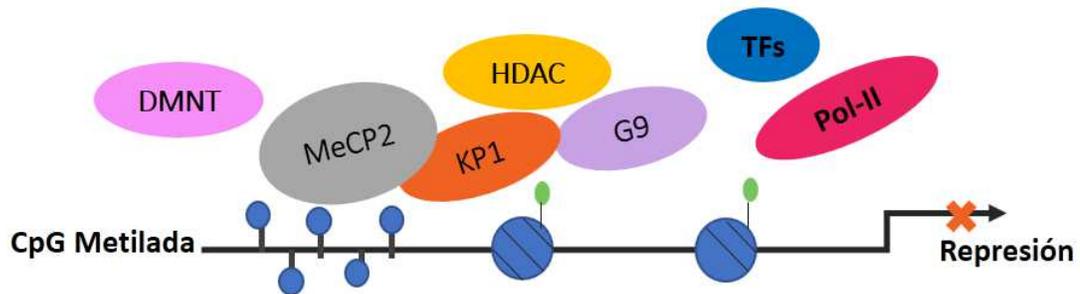
Proponemos que la programación fetal por nutrientes puede inducir cambios epigenéticos y modular en desarrollo de adicción en la descendencia. A continuación, se describirán estrategias farmacológicas de regulación epigenética durante la activación de la microglia y su efecto en el desarrollo de adicción.



**Figura 4.** Modulación de la programación fetal por factores in y extra-útero. La vida intrauterina representa un período de tiempo particularmente sensible cuando los efectos de los estados y condiciones maternos alrededor de la concepción y durante el embarazo pueden transmitirse al embrión/feto en desarrollo. En la imagen se hacen mención de factores como dieta alta en grasa, hiperglicemia, desnutrición y fertilización In Vitro (IVF) como factores de programación fetal in Utero que resultan en obesidad, resistencia a la insulina e hipertensión

## 2.7 Modulación farmacológica de la epigenética en la activación de la microglia

La metilación del ADN es la transferencia covalente de un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina a citosinas en dinucleótidos CpG. Los genomas de mamíferos están marcados por secuencias de ADN que contienen un gran número de sitios CpG denominados islas CpG en los promotores génicos (Illingworth & Bird, 2009). Los cambios en la metilación del ADN, como la hipometilación, a menudo están asociados con la inestabilidad cromosómica y la activación de elementos transponibles en cánceres humanos.(Jones & Liang, 2009).



**Figura 5** La metilación del ADN es catalizada por una familia de metiltransferasas, El ADN metilado puede reclutar las proteínas del dominio de unión a metil-CpG Kaiso, MeCP2 y miembros de la familia MBD, que reconocen 5-metilcitosinas en islas CpG y participan en el silenciamiento de la cromatina (Bayarsaihan, 2011).

La metilación del ADN es catalizada por una familia de metiltransferasas de ADN estrechamente relacionadas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b). DNMT1 es una metiltransferasa de mantenimiento y es la ADN metiltransferasa más abundante en mamíferos. Sobre todo, agrega metilación al ADN cuando una cadena ya está metilada (hemi-metilada). (Hermann, Gowher, & Jeltsch, 2004). El ADN metilado puede reclutar las proteínas del dominio de unión a metil-CpG Kaiso, MeCP2 y miembros de la familia MBD (Fig. 3), que reconocen 5-metilcitosinas en islas CpG y participan en

el silenciamiento de la cromatina (McCabe, Brandes, & Vertino, 2009). Para la metilación del ADN se requiere la cola N-terminal de la histona H3 con una lisina 4 no metilada (H3K4). La proteína NP95, que contiene los dominios SET, Ring y Tudor, es responsable de unir DNMT1 con ADN e histona H3 metilación (H3K9me3). Por lo tanto, NP95 coordina dos principales vías de silenciamiento epigenético, la metilación del ADN y la metilación de histonas (X. Cheng & Blumenthal, 2010; J.-L. Hu et al., 2009; Rottach et al., 2009). A continuación, describiremos estrategias farmacológicas de modulación del metiloma y su efecto en la activación de la microglia.

- Metionina

La metilación del ADN es uno de los principales fenómenos epigenéticos que afectan la expresión génica. La metionina es un precursor de la S-adenosilmetionina (SAM) en el metabolismo hepático del carbono (N. Zhang, 2018). Niveles altos de metionina en la dieta (1.5%) en ratas destetadas durante 2 semanas genera acumulación de 4 - 30 veces de metionina en el intestino, hígado, músculo esquelético, riñón y plasma, en comparación con una dieta que contiene metionina al 0.61% (Regina, Korhonen, Smith, Alakuijala, & Eloranta, 1993). Además, inyección de metionina (100 mg/kg) en ratas aumenta 7 veces sus niveles en el hipocampo respecto al control (Regina et al., 1993; N. Zhang, 2018). De interés, la suplementación de metionina a ratones, induce la hipermetilación del promotor de la relina y decrece su expresión en la corteza cerebral (Tremolizzo et al., 2002; Waterland, 2006; N. Zhang, 2018). Generalmente, los patrones de metilación del ADN son específicos del tejido y, por lo tanto, no siempre se correlacionan negativamente con la expresión génica, lo que desafía la opinión tradicional de que la metilación del ADN reprime la expresión génica.

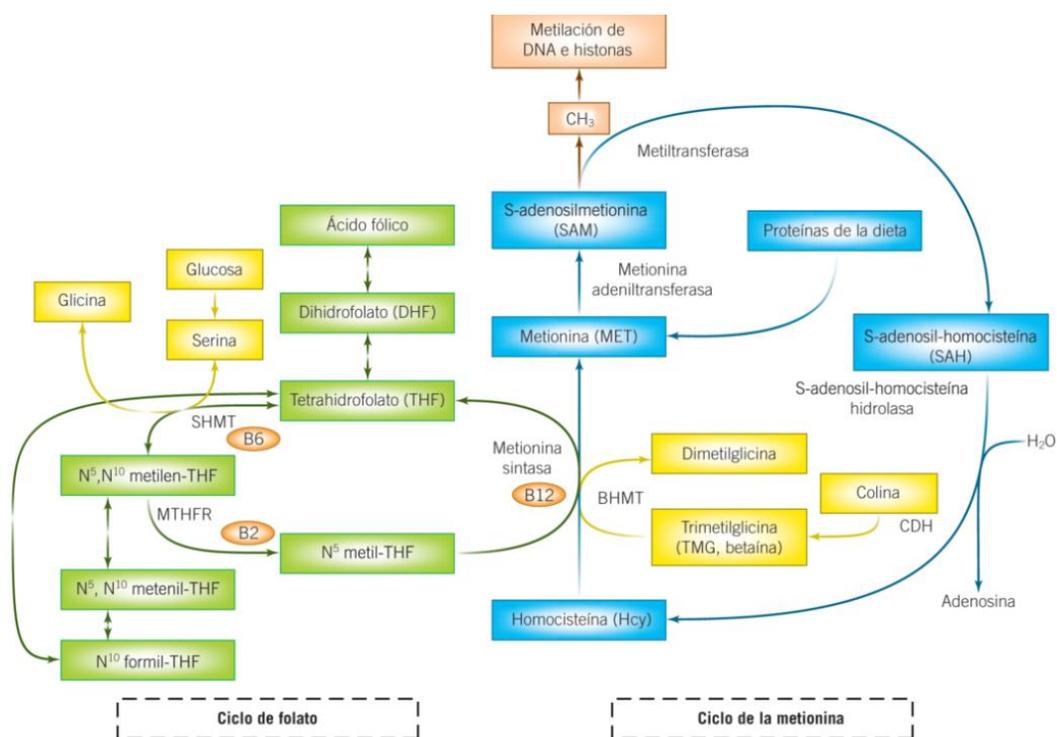
Son pocos los estudios que demuestran contundentemente el efecto de la metilación sobre la activación del perfil inflamatorio y expresión de citocinas. Se ha demostrado que la expresión del gen  $IL1\beta$  está regulada por la metilación del ADN en el envejecimiento de la microglía. De hecho, la hipometilación del gen  $IL1\beta$  se asocia con la regulación positiva de la producción de citocinas en dos modelos diferentes de envejecimiento (Cho et al., 2015) (Matt et al. en 2016). Además, se ha identificado que

en el tratamiento con LPS o mediante la estimulación de la microglía con los ligandos TLR3 y TLR4, se estimula la DNMT3L que correlaciona con la activación de la microglía (Das et al., 2015).

La microglia se puede comparar con las células madre en su capacidad para adaptarse al microambiente y para diferenciarse en un fenotipo celular específico en respuesta a la activación de la señal. Hasta ahora, los mecanismos que llevan a su activación hacia un fenotipo específico aún no están completamente establecidos, pero los cambios epigenéticos deberían contribuir a la plasticidad de la microglia, incluidas las modificaciones de histonas, la metilación del ADN o la expresión de microARN, así como los sistemas enzimáticos que regulan esas modificaciones, pueden tener en la regulación de la plasticidad de la microglía y la polarización hacia fenotipos únicos además de la activación hacia un perfil promotor de la inflamación.(Cheray & Joseph, 2018)

### **2.7.1 S-Adenosilmetionina**

La S-Adenosilmetionina o SAM, es un donador de radicales metilos fisiológicos que participa en las reacciones de transmetilación enzimática y está presente en todos los organismos vivos. La S-adenosilmetionina, formada por la reacción de la L-metionina y el trifosfato de adenosina catalizada por la enzima S-adenosilmetionina sintetasa, es el donante del grupo metilo en la biosíntesis de los ácidos nucleicos del ADN y del ARN, fosfolípidos, proteínas, epinefrina, melatonina y creatina, entre otras (Wishart et al., 2018). De manera general, SAM sirve como donante de un grupo metilo en muchas reacciones de metiltransferasa, incluida la metilación del ADN, y se convierte en S-adenosil-L-homocisteína (SAH). La SAH es un potente inhibidor de las DNMT, especialmente de la DNMT1.



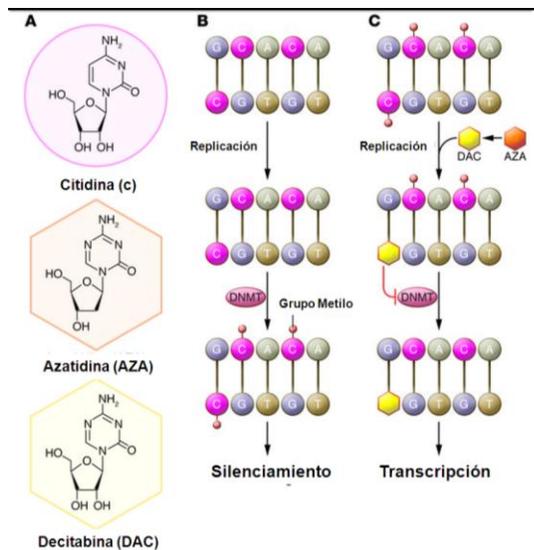
**Figura 6** Metabolismo de la metionina. La homocisteína se convierte en metionina a través de la metionina sintasa o la betaína homocisteína metiltransferasa. La metionina sintasa requiere vitamina B12 como un cofactor para transferir un grupo metilo de metiltetrahydrofolato a homocisteína para formar S-metionina. Betaína homocisteína metiltransferasa transfiere un grupo metilo de la betaína para formar S-metionina. La interconversión de homocisteína y cisteína, a través de la cistationina intermedia, se denomina vía de transulfuración. La cistationina  $\beta$ -sintasa cataliza la conversión de homocisteína en cistationina y agua. La cistationina se convierte luego en cisteína por la actividad enzimática de la cistationina  $\gamma$ -liasa. La vitamina B6 es requerida como co-enzima tanto por la cistationina  $\beta$ -sintasa como por la cistationina  $\gamma$ -liasa. (Soda, 2018; B. Zhang et al., 2015).

Los niveles altos de SAM, por un lado, desregulan la metilación celular y alteran las concentraciones de neurotransmisores en el cerebro (Seminotti et al., 2018). Por el otro, el agotamiento de SAM puede reducir las concentraciones de glutatión (GSH) debido a la conversión alterada de metionina en cisteína, lo que altera el estado redox de las células. En este contexto, el decremento de GSH se asocia a alta producción de ROS y daño cerebral (Seminotti et al., 2018). Además, se ha establecido que la S-adenosil-L-metionina es el principal donante de metilo en las reacciones de metiltransferasa y que la suplementación con SAM restaura los GSH y atenúa la lesión

hepática asociado a la enfermedad hepática crónica (Guo, Chang, Xiao, & Liu, 2015). SAM también se ha utilizado clínicamente para el tratamiento de la enfermedad hepática, la artritis y la depresión. Por ejemplo, la administración de SAM produjo una mejoría cognitiva en pacientes con Enfermedad de Alzheimer (Matt, Lawson, & Johnson, 2016). Se ha confirmado que el tratamiento con SAM es tan eficaz como los antidepresivos tricíclicos recetados y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), con eficacia para el tratamiento de algunas afecciones hepáticas, como colestasis en el embarazo y colestasis intrahepática asociado con enfermedades del hígado. Más significativamente, la SAM es bien tolerada y no se han observado efectos secundarios graves (Hao et al., 2016).

### **2.7.2 5-Azacidina**

La azacidina es un análogo del nucleósido pirimidina de la citidina con actividad antineoplásica. La azacidina se incorpora al ADN, donde inhibe de forma reversible la ADN metiltransferasa, bloqueando así la metilación del ADN.(Patel et al., 2017; Samanta, Rajasingh, Cao, Dawn, & Rajasingh, 2017). En este sentido, la inducción de la hipometilación del ADN mediante la inhibición de DNMT1 reduce el fenotipo inflamatorio asociado a la regulación a la baja de la activación de la vía de Janus kinase (JAK) -2 / STAT3, posterior a la estimulación con LPS (C. Cheng et al., 2014). En este sentido, la inhibición de DNMT3b induce un cambio de polaridad de fenotipo anti inflamatorio M2 en macrófagos de ratones obesos (Yang et al., 2014).

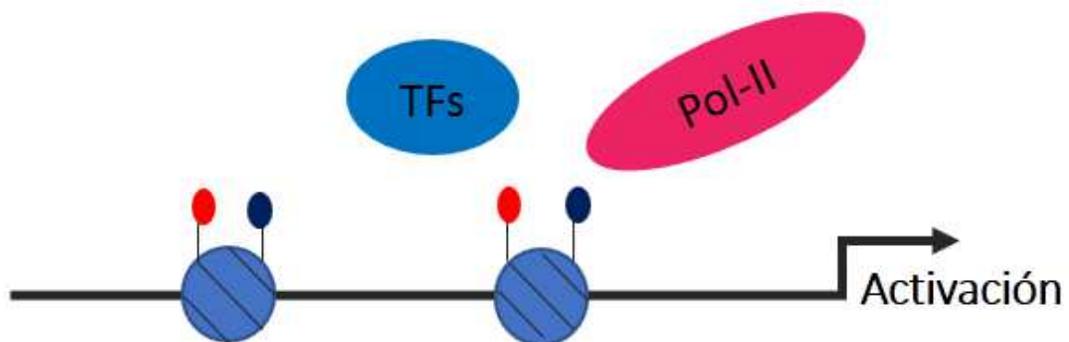


**Figura 7** Mecanismo de acción de la 5-Aza. La 5-azacitidina es un análogo de la citosina que puede incorporarse al ADN durante la replicación, lo que provoca un efecto acumulativo en los niveles de metilación del ADN en sitios CpG específicos (Modificada de Shyamala C. Navada, Juliane Steinmann, Michael Lübbert, Lewis R. Silverman, 2014)

La unidad básica de la cromatina, el nucleosoma, consiste en un segmento corto de ADN envuelto alrededor de las histonas centrales formadas por dos copias de H2A, H2B, H3 y H4, que proporcionan una estructura rígida. La modificación covalente de histonas es un mecanismo epigenético esencial de regulación de genes. Estas modificaciones postraduccionales (metilación de lisinas y argininas, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación y ADP-ribosilación) ocurren con mayor frecuencia en las colas N-terminales de las histonas centrales. (Campos & Reinberg, 2009; Garden, 2013). La acetilación de histonas se asocia con una conformación de cromatina "abierta" que facilita la transcripción. El N-terminal acetilado que sobresale del núcleo de nucleosoma proporciona afinidad reducida para el ADN, lo que permite que la cromatina pueda adoptar una estructura más relajada para el reclutamiento de la maquinaria básica de transcripción (Campos & Reinberg, 2009; X. Cheng & Blumenthal, 2010).

Las histonas son acetiladas por las enzimas histonas acetiltransferasas (HATs), mientras que las histonas desacetilasas (HDAC) eliminan estas modificaciones. Las

HDAC revierten la actividad de HAT al hacer que la cromatina se vuelva más condensada promoviendo la represión genética. En contraste, la metilación de histonas puede mantener la cromatina en un estado activado o reprimido. La tri-metilación de la histona H3 en la lisina 4 y 36 (H3K4me3 y H3K36me3) facilita una cromatina abierta para la transcripción activa (Bayarsaihan, 2011; Lecoutre et al., 2017). Por el contrario, las metilaciones de histonas en las lisinas 9 y 27 (H3K9me3 y H3K27me3) se asocian generalmente con una condensación de la cromatina y el silenciamiento génico. Los genes con modificación bivalente (H3K4me3 y H3K27me3) son típicamente importantes reguladores del desarrollo en células embrionarias pluripotentes (ES) o células progenitoras multipotentes silenciadas. Los potenciadores, que determinan la expresión génica específica de tejido, están marcados por la monometilación de histona H3 lisina 4 (H3K4me1) y por los cofactores de histona acetiltransferasa CBP/p300. La metilación de las histonas se lleva a cabo mediante las histonas metiltransferasas (HMT) y la desmetilación por histonas desmetilasas (HDM), como miembros de la familia de proteínas Jumonji.(X. Cheng & Blumenthal, 2010; Lecoutre et al., 2017; Mikkelsen et al., 2007). A continuación, describiremos estrategias farmacológicas de modulación de la acetilación y su efecto en la activación de la microglia.



**Figura 8** Las histonas son acetiladas por las enzimas histonas acetiltransferasas (HATs), mientras que las histonas desacetilasas (HDAC) eliminan estas modificaciones, impidiendo la unión de factores de transcripción y enzimas como la polimerasa. El estado acetilado se controla a través de las actividades opuestas de las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas desacetilasas (HDAC). Los HAT

neutralizan el grupo amino cargado positivamente de residuos de lisina específicos al transferir un grupo acetato de acetilCoA al resto de lisina, mejorando así su acetilación y haciendo más accesible el ADN al disminuir la afinidad de unión entre la cola de histonas y el ADN. Por el contrario, la lisina positiva se une a ADN cargado negativamente en ausencia del grupo acetilo.

### **2.7.3 Ácido suberoilánidido hidroxámico (SAHA)**

SAHA es un pan-inhibidor de HDAC que pertenece estructuralmente al grupo de los ácidos hidroxámicos. SAHA (Vorinostat) fue el primer inhibidor de la HDAC aprobado por la FDA y es un inhibidor eficaz del crecimiento de células tumorales en el cáncer de próstata.(X.-Y. Shi, Ding, Li, Zhang, & Zhao, 2017). De manera general, SAHA induce la inhibición de la HDAC, mejora la acetilación de histonas, lo que conduce a la relajación de la cromatina y modifica la expresión génica. Recientemente, se identificó que la inhibición de HDAC promueve respuesta anti inflamatoria (Mohammadi, Sharifi, Pourpaknia, Mohammadian, & Sahebkar, 2018). Por ejemplo, la inhibición de HDAC decrece la activación de la vía NF- $\kappa$ B (Choo, Ho, Tanaka, & Lin, 2010), decreciendo la producción de mediadores inflamatorios, incluidas quimiocinas y el óxido nítrico (NO).

La inhibición de la HDAC empleando TSA y/o SAHA suprime la expresión y liberación de citocinas de la microglia inducida por LPS (Kannan et al., 2013). Además, la inducción de la acetilación de la H3K9ac por SAHA promueve la activación microglial in vivo (Cheray & Joseph, 2018; Q. P. Hu & Mao, 2016). Por su parte, la hiperacetilación inducida por el tratamiento con TSA mejora el aprendizaje a largo plazo y la disfunción cognitiva en ratones tratados con LPS (Hsing et al., 2015) (Fleiss, Nilsson, Blomgren, & Mallard, 2012). Adicionalmente, la inhibición de la HDAC por el butirato de sodio (SB) induce cambios en la forma de la microglía, con aparición de alargamiento de los procesos microgliales en condiciones inflamatorias y normales asociadas con cambios en los marcadores de microglía proinflamatoria y antiinflamatoria(P. Wang et al., 2018). El SB también induce el enriquecimiento y la transcripción de H3K9ac en los promotores de genes pro inflamatorios de la microglía (Tnf- $\alpha$ , Nos2, Stat1, IL6 e IL10)(P. Wang et al., 2018)

Molecularmente, las HDAC influyen en la transcripción de genes modificando las regiones promotoras de las citocinas. La capacidad de las HDAC para modificar también proteínas no histónicas, incluidos los factores de transcripción como STAT3, resalta aún más el importante papel de estas enzimas en la regulación del gen de las citocinas. De hecho, se ha demostrado que la producción de citocinas por las células inmunitarias está regulada por cambios en el estado de acetilación de sus promotores. La participación de las HDAC en la regulación de las citocinas no está restringida a ninguna clase o subtipo específico de citocinas. De hecho, las HDAC parecen participar en la regulación transcripcional de las citocinas pro y antiinflamatorias (P. Kumar et al., 2017). Por lo que al utilizar iHDAC como SAHA la modificación de expresión de genes proinflamatorios es de esperarse.

## **2.8 Metilación del ADN como un modulador de la activación de la microglia y adicción**

Pocos estudios han evaluado el efecto de la regulación de la expresión génica por la metilación del ADN en microglía y su correlación con la conducta adictiva. Por ejemplo, la exposición de ratas a la morfina conduce a un aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas en el NAc, mientras que el incremento de la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10) reduce la conducta de adicción (Schwarz, Hutchinson, & Bilbo, 2011). Además, se han descrito cambios en la metilación de residuos de citosina asociados con neuroadaptaciones subyacentes a manifestaciones en la conducta (Ghavifekr Fakhr, Farshdousti Hagh, Shanehbandi, & Baradaran, 2013). Con ello, las influencias ambientales, como los comportamientos de búsqueda de drogas, pueden inducir alteraciones a la metilación del ADN. Por ejemplo, la autoadministración, extinción y reincorporación de la cocaína se asocia con una regulación al alza de la expresión del gen temprano inmediato c-Fos en estriado y corteza cerebral, y con una disminución de la metilación de los dinucleótidos CpG en su región promotora. De interés, la suplementación con metilo a través de la l-metionina crónica atenuó el restablecimiento inducido por fármacos, bloqueó la regulación positiva de c-Fos inducida por cocaína y rescató la metilación de CpG al

nivel de control (Elvir, Duclot, Wang, & Kabbaj, 2017; Iurescia, Seripa, & Rinaldi, 2016).

El DNMT y sus cambios asociados en la metilación del ADN están regulados por el uso de drogas con especificidad de paradigma regional, temporal y de comportamiento. Hay evidencia de que la cocaína aumenta rápida y transitoriamente el ARNm de la Dnmt3a en ratones. De interés, la abstinencia a la cocaína en este modelo incrementa la expresión de Dnmt3a en el NAc (Massart et al., 2015). Curiosamente, esta hipermetilación se revierte rápidamente después de una ‘recaída’ (Massart et al., 2015). Además, se ha reportado que la cocaína disminuye la metilación del ADN en el promotor cFos y en el promotor del exón IV del gen BDNF (Wright et al., 2015). Estos reportes proponen que los patrones de hipermetilación aparecen en el NAc durante la abstinencia y se revierten rápidamente después de la búsqueda de drogas.

La importancia funcional de la regulación mediada por la cocaína de la metilación del ADN y las DNMT se ha reportado en diversos estudios, pero existe cierto desacuerdo en cuanto a su papel en los comportamientos relacionados con la adicción. Por ejemplo, el inhibidor farmacológico de la DNMT3A, zebularina, retrasa mientras que el donante de metilo S -adenosilmetionina (SAM), promueve la sensibilización locomotora de la cocaína (Anderson et al., 2018). Asimismo, el inhibidor farmacológico de DNMT, RG108, a corto o largo plazo redujo la búsqueda de cocaína en el ensayo de autoadministración de cocaína (Massart et al., 2015). Es de destacar que las inyecciones sistémicas del inhibidor de la DNMT, la 5-azacitidina, reduce también el consumo de etanol, sugiriendo efectos conductuales comunes de las DNMT que muestran múltiples drogas de abuso (Warnault, Darcq, Levine, Barak, & Ron, 2013).

### **2.8.1 Modificación de Histonas como un modulador de la activación de la microglia y adicción**

Se han identificado varias moléculas inhibitoras de las HDAC (HDACi), algunas de las cuales se encuentran actualmente en uso clínico para el tratamiento del cáncer, que cuentan con potentes efectos anti inflamatorios (Gräff et al., 2012)(Eckschlager, Plch, Stiborova, & Hrabeta, 2017; L. Wang, de Zoeten, Greene, & Hancock, 2009). Como ejemplo, el ácido valproico (VPA), es un inhibidor no selectivo de la HDA aprobado por la FDA que se usa para tratar la epilepsia y los trastornos bipolares. El VPA suprime la expresión de los genes de quimiocinas y citocinas, de moléculas antivirales innatas (como el IFN $\beta$ ) y de proteínas relacionadas con la activación de la vía de señalización TLR3-TLR4 (Suh et al., 2010) y también se ha empleado en la reducción de la respuesta inflamatoria inducida por lesión en la médula (Abdanipour, Schluesener, & Tiraihi, 2012).

Hay cambios inducidos por fármacos en la acetilación de histonas, estos se han detectado después de la exposición a cocaína, metanfetamina, alcohol, tolueno y heroína. Los aumentos inducidos por los medicamentos en la acetilación a menudo se asocian con un aumento de las respuestas de comportamiento a la administración de medicamentos, y la exposición aguda y crónica a los medicamentos puede producir patrones superpuestos y distintos de acetilación de histonas, además la exposición a drogas de abuso aumenta la acetilación general en H3 y H4 NAc (Anderson et al., 2018). En este contexto, se ha planteado que la activación neuroinmune en el cerebro contribuye al daño cerebral y los cambios de comportamiento también se han asociado con el consumo de alcohol. En los últimos años, muchos estudios han informado que el consumo crónico de alcohol puede aumentar las citocinas proinflamatorias y la expresión innata de genes inmunes en el cerebro. Por ejemplo, el tratamiento de ratones con LPS a través de su unión al TLR4, muestra aumento en el consumo de etanol y la preferencia que persiste durante meses(Alfonso-Loeches et al., 2010) Además, la ingesta de etanol disminuyó la expresión de HDAC y aumentó la acetilación del high mobility group box 1 (HMGB1)(Zou & Crews, 2014).Por su parte, el bloqueo de los TLR4 inhiben la activación neuroinmune inducida por etanol. Estos estudios sugieren

que las HDAC cerebrales están vinculadas a la señalización neuroinmune HMGB1-TLR4 (Zou & Crews, 2014).

## **2.9. Programación metabólica por nutrientes, inflamación y su efecto potencial en la transmisión de conducta semejante a la adicción en la descendencia**

La programación fetal por ingesta de alimento calórico o la presencia de obesidad materna incrementan la susceptibilidad en la descendencia de desarrollar alteraciones metabólicas y de comportamiento en etapas tempranas de la vida (Tabachnik, Kisliouk, Marco, Meiri, & Weller, 2017). La obesidad en el embarazo es un problema creciente de salud pública ya que su presencia se asocia con una serie de efectos adversos para la madre y el feto, incluida diabetes gestacional, preeclampsia, e inclusive muerte intrauterina (Bilbo & Tsang, 2010; Cedergren, 2004). Nuestro grupo de investigación, y algunos otros, han demostrado que los efectos negativos de la presencia de obesidad materna en la descendencia se presentan inclusive a nivel del sistema nervioso central y pueden permanecer a largo plazo y estar presentes hasta la segunda generación (Segovia, Vickers, Gray, & Reynolds, 2014). En este contexto, se ha identificado que la alimentación con alto contenido de grasa a ratones induce la hipometilación del ADN de genes asociados a la inflamación en el tejido adiposo que se preserva hasta la tercera generación (X. Wang et al., 2016). Por otra parte, la obesidad materna puede programar la inflamación dentro del cerebro de la descendencia a largo plazo, particularmente en regiones importantes para la cognición, como el hipocampo, es prácticamente desconocida. (Bilbo & Tsang, 2010; McNaull et al., 2010; Shaftel, Griffin, & Kerry, 2008). La presencia de obesidad correlaciona también con inflamación en el hipotálamo (Ávalos, Kerr, Maliqueo, & Dorfman, 2018) y puede estar presente en el cerebro de la descendencia de madres expuestas a dieta calórica (Czeh, Gressens, & Kaindl, 2011). En este contexto, se sabe que la microglía se infiltra en el cerebro sano durante la gestación temprana y mantiene un grupo de residentes durante toda la vida, activando la neuroinmunidad innata y adaptativa, y regula el número de proyecciones y el refinamiento de las sinapsis (Ginhoux et al., 2013). Sin embargo, las perturbaciones inflamatorias en el cerebro en desarrollo

pueden hacer que estas células pasen de funciones fisiológicas a más patológicas, tanto de forma aguda como persistente (Paolicelli et al., 2011; Paolicelli & Ferretti, 2017).

De importancia, nuestro grupo de investigación y algunos otros en el mundo, han identificado que la programación fetal por exposición de madres a una dieta alta en grasa durante la gestación fomenta el comportamiento adictivo a recompensas naturales y sintéticas (Camacho, 2017; Naef et al., 2011)(Lillycrop et al., 2008; Montalvo-Martínez, Maldonado-Ruiz, Cárdenas-Tueme, Reséndez-Pérez, & Camacho, 2018; Vanhees et al., 2014)). En este contexto, la exposición a un perfil lipídico en las primeras etapas de la vida parece ser un potente modulador del funcionamiento neuro-inmune a lo largo de la vida. De hecho, los descendientes de madres alimentadas con grasa rica en grasas trans alta durante el embarazo y la lactancia exhiben una mayor actividad inmune basal (proteína C reactiva) al nacer y un aumento de la microglía activa en adultos. Estos cambios basales se acompañan de una respuesta exagerada periférica e hipocámpica de IL-1 $\beta$  al LPS adulto, conocido clásicamente por activar la microglía (Bilbo & Tsang, 2010; Hoeijmakers, Lucassen, & Korosi, 2015).

A pesar de la evidencia experimental que justifica la presencia de la activación de la microglia durante la programación fetal por nutrientes o bien durante la presencia de obesidad materna, no existen datos experimentales que demuestren que, en estos escenarios, se promueve el desarrollo de conducta de adicción a recompensas naturales en la descendencia. Con ello, se propone que durante la obesidad o sobrealimentación materna se induce la activación de mecanismos epigenéticos modulando positivamente la expresión de un perfil de inflamación cerebral que favorece la transmisión del fenotipo adictivo a la descendencia a través de herencia transgeneracional.

## **CAPITULO 3**

### **3 JUSTIFICACIÓN**

La programación nutricional materna favorece la conducta de adicción al consumo de alimentos hipercalóricos en la descendencia. En el contexto de obesidad/sobrenutrición se presenta la activación de inflamación sistémica y central. Se desconoce si durante la programación nutricional materna la activación del perfil inflamatorio se asocia a mecanismos epigenéticos selectivos.

Por lo anterior, en este trabajo identificaremos en un modelo animal si la descendencia de madres sometidas a programación nutricional presenta conducta de adicción a la comida que correlacione con alteraciones en el perfil de metilación/acetilación del DNA de genes proinflamatorios.

## **CAPITULO 4**

### **4 HIPÓTESIS:**

La programación materna con dieta calórica modula el perfil de metilación de genes proinflamatorios en el cerebro favoreciendo el desarrollo de conducta similar a la adicción y su modulación por agentes metilantes revierte el fenotipo

## **CAPITULO 5**

### **5 OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo General:**

Identificar si la programación nutricional materna favorece la presencia de conducta similar a la adicción en la descendencia, a través de cambios en el perfil de metilación/acetilación del DNA de genes pro-inflamatorios

#### **5.2 Objetivos Específicos:**

1. Evaluar si la modulación farmacológica del perfil Metilación/Acetilación modula la expresión de genes inflamatorios en línea celular de microglía SIM-A9
2. Identificar si la descendencia de madres expuestas a programación nutricional presenta conducta similar a la adicción e incremento en el perfil de metilación global y específica de genes proinflamatorios
3. Confirmar si la modulación del metiloma revierte/exacerba el comportamiento similar a la adicción de la descendencia

## CAPITULO 6

### 6 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 6.1 Material de Laboratorio

Tabla 1

Tabla 1. Material Biológico y No Biológico	
No Biológico	
▪	Pellets de chocolate (45mg), BioServ/ No. Catálogo F05472).
▪	Comida estándar para rata (LabDiet/ No. Catálogo 5001).
▪	Dieta de cafetería (CAF) con 372 Kcal/100g distribuidas en 39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas.
▪	Estuche de disección.
▪	Rat Brain Atlas, Paxinos y Watson.
▪	Vaso de precipitado de 50 mL, 100 mL, 1000 mL
▪	Matraz de aforación 1000 mL
▪	Micropipetas eppendorf de 1000 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 2.5 $\mu$ L y 1 $\mu$ L.
▪	Puntillas para micropipetas: azules, amarillas y blanca, estériles
▪	Filtros de jeringa estériles Millex™-GP con membrana de PES
▪	Filtros de vacío/sistemas de almacenamiento desechables Corning™
▪	Placas PCR tiempo real 96
▪	Tubos eppendorf de 1.5 ml, 0.6 ml y 0.2, estériles.
▪	Tubos Falcon 50ml y 15ml, estériles.
▪	Guantes sin talco.
▪	Gradillas de nitrilo
▪	Placas de cultivo celular de fondo plano Costar™ 96 pozos, 12 pozos, 6 pozos
▪	Raspadores de células Nunc™
▪	Frasco de Cultivo celular 75cm y 25 cm.
Biológicos	
▪	Ratas Wistar. Sexo: machos y hembras. Edad: 8 – 10 semanas. Peso: 200-300g
▪	Línea Celular SIM-A9 (ATCC® CRL-3265™)

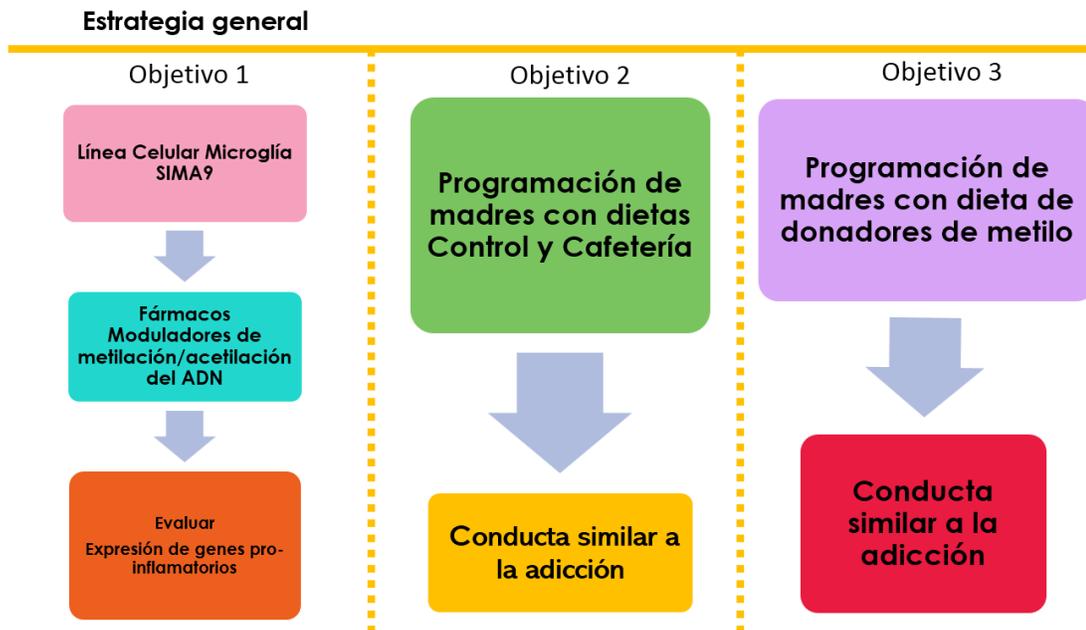
Tabla 2. Reactivos	
❖	Etanol al 70%. □
❖	Hipoclorito de sodio 1:10
❖	Solución salina al 0.9%. □
❖	Agua DEPC estéril.

❖ Buffer TBE 1X.
❖ RNAlater (Ambion, Inc./No. Catálogo AM7020).
❖ RNaseZAP (Ambion, Inc./ No. Catálogo AM9780).
❖ Alcohol etílico 96-100%, grado molecular (J.T. Baker).
❖ 2-Mercaptoethanol (BioRad/ No. Catálogo 1610710).
❖ EDTA (Sigma Aldrich/ No. Catálogo E9884).
❖ Kit de extracción de RNA: RNeasy Mini kit (50) (QIAGEN/ No. Catálogo 74104).
❖ Kit de extracción de DNA: DNeasy Blood & Tissue Kit (50) (QIAGEN/ No. Catálogo 69504).
❖ EGTA
❖ Glucosa
❖ Medio de cultivo F-12 Ham
❖ PBS
❖ Lipopolisacárido
❖ SAHA: Sigma Aldrich (SML0061-5mg) Lot# 106M4705V
❖ 5-Aza-2'-deoxycytidine: Sigma Aldrich (A3656-10mg) Lot#SLBW8944
❖ Dimetilsulfoxido >99.5% filtrado Lot#SHBD7446V)
❖ Cell Proliferation Kit I (MTT) Cat. No. 11 465 007 001 de Sigma Aldrich
❖ Ficoll-Paque TM PLUS 17-1440-02 Lot:10269946

**Tabla 3**

Tabla 3. Equipo de Laboratorio
○ Caja de condicionamiento operante (OmniAlva)
○ Sonicador Q125 (QSonica).
○ Cabina de bioseguridad: Purifier Logic+ Class II (LABCONCO)
○ Microcentrífuga 5417R (Eppendorf).
○ NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).
○ Vortex
○ Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).
○ LightCycler® 480 Instrument II
○ Centrifuga tubos 15mL
○ Termociclador RT
○ Microscopio
○ Thermomixer confort (Eppendorf).
○ GloMax® Discover

## 6.2 Estrategia Experimental

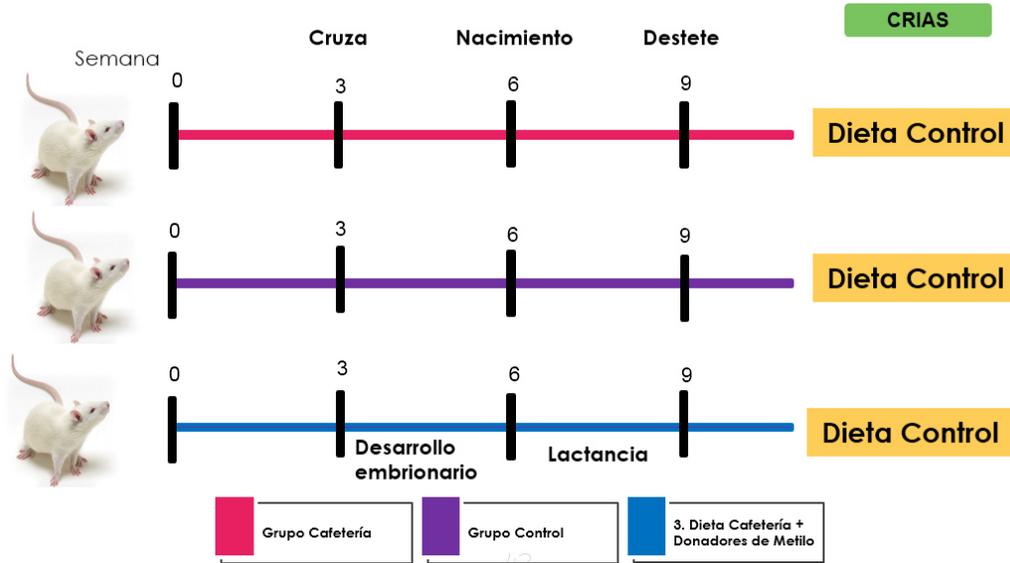


## 6.3 Metodología

Se utilizaron 30 ratas machos de la cepa Wistar de una edad aproximada de 8-10 semanas y de un peso de 200-300g. Los modelos fueron manejados en el laboratorio de Neurometabolismo y Bioterio del CIDICS de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Los ejemplares se mantuvieron en cajas individuales a temperatura de 20-23°C y con un ciclo de luz/oscuridad de 12h. Con disponibilidad de agua y alimento acorde al experimento.

### 6.3.1 Programación Fetal de la descendencia

Ratas Hembras Wistar 8-10 semanas



**Figura 9** Grupos experimentales evaluados. Grupo 1 Ratas hembras con dieta control durante las 9 semanas, Grupo 2 ratas hembras con dieta de cafetería por 9 semanas y Grupo 3 ratas hembras con dieta de cafetería adicionada con donadores de metilo. Las 9 semanas incluyen 3 semanas antes de la cruce, el desarrollo embrionario y hasta el destete. Las crías solo fueron expuestas a dieta control.

#### ○ **Dieta Hipercalórica:**

Para la dieta hipercalórica se realizó una mezcla de los siguientes componentes

Dieta de cafetería
Galletas Marías
Papitas “Sabritas Original”
Chocolate líquido Hershey's
Tocino Fud
Pate de cerdo Zwan
Polvo de pellets de comida estándar

La cual contiene 372 kcal/100 g distribuidas en 39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas.

La dieta de cafetería adicionada con donadores de metilo se realizó mezclando los mismos ingredientes de la dieta de cafetería y los siguientes componentes: Betaína (5

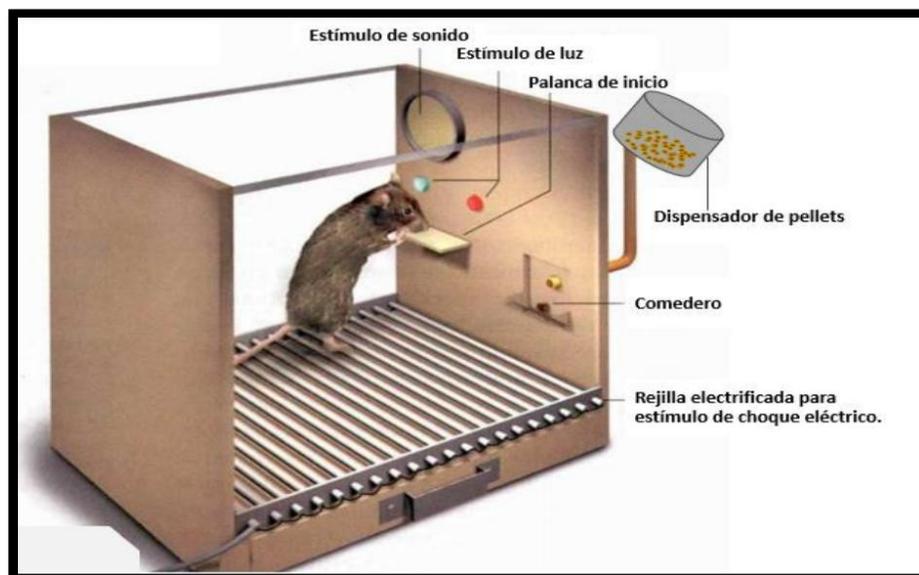
g / kg de dieta), Colina (5,37 g / kg de dieta), Ácido fólico (5,5 mg / kg de dieta), vitamina B12 (0,5 mg / kg de dieta).

Ambas dietas se administraron por 9 semanas como se indicó en la figura.

### 6.3.2 Condicionamiento Operante:

Para evaluar la conducta motivante para la obtención de recompensas naturales en la descendencia se empleó la prueba de condicionamiento operante en la caja de Skinner

1. Se sometió a restricción calórica a cada grupo de ratas exponiéndolas a 15g de alimento/día durante 7 días. Con este protocolo se espera que los sujetos muestren decremento del 10% de su peso
2. Las ratas se sometieron al entrenamiento de condicionamiento operante siguiendo protocolos ya establecidos (Sharma, Hryhorczuk, & Fulton, 2012) en la caja de entrenamiento OmniAlva.



**Figura 10** Descripción gráfica de los componentes de la caja de comportamiento operante (caja de Skinner).

Funcionamiento: La caja de comportamiento operante cuenta con una palanca de inicio, la cual al ser accionada (presionada), permite la liberación de un pellet de comida (recompensa) hacia el comedero. Al mismo tiempo en el que ocurre la liberación del pellet, se activan los estímulos de luz y sonido por un lapso de 2 segundos, esto para generar una asociación entre la liberación de la recompensa y los estímulos (respuesta condicionada).

3. Las ratas se entrenaron individualmente siguiendo los protocolos FR1, FR5 y PR, con los parámetros de asociación a: 2 segundos de luz y 2 segundos de sonido con 5 segundos de inter-ensayo, ajustados a la liberación del pellet en el receptáculo de la caja

4. La duración de cada protocolo es el siguiente:

-Protocolo FR1 por 3 días consecutivos; duración 1 hora.

-Protocolo FR5 por 4 días consecutivos; duración 1 hora.

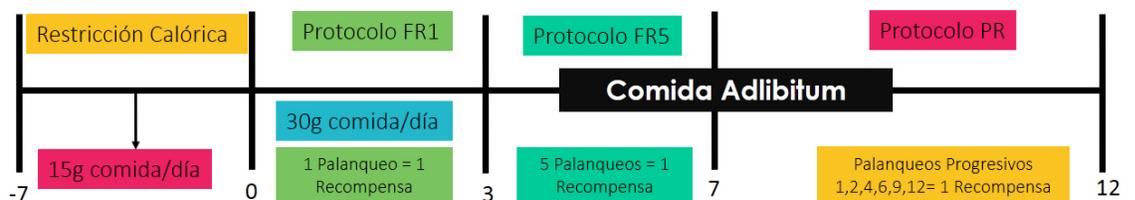
-Protocolo PR por 5 días consecutivos; duración dependiendo de la actividad del animal, máximo 1 hora.  $PR = [5e (R*0.2)] - 5$ , en donde R es igual al número de recompensas ganadas menos 1. Con ello, se requiere el siguiente orden de estimulación en la palanca para ganar una recompensa: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, etc.

5. Se colocó la cantidad de comida estándar correspondiente, a cada rata, después de terminado cada protocolo.

-Después de protocolo FR1 se expuso a 30 gramos de comida estándar.

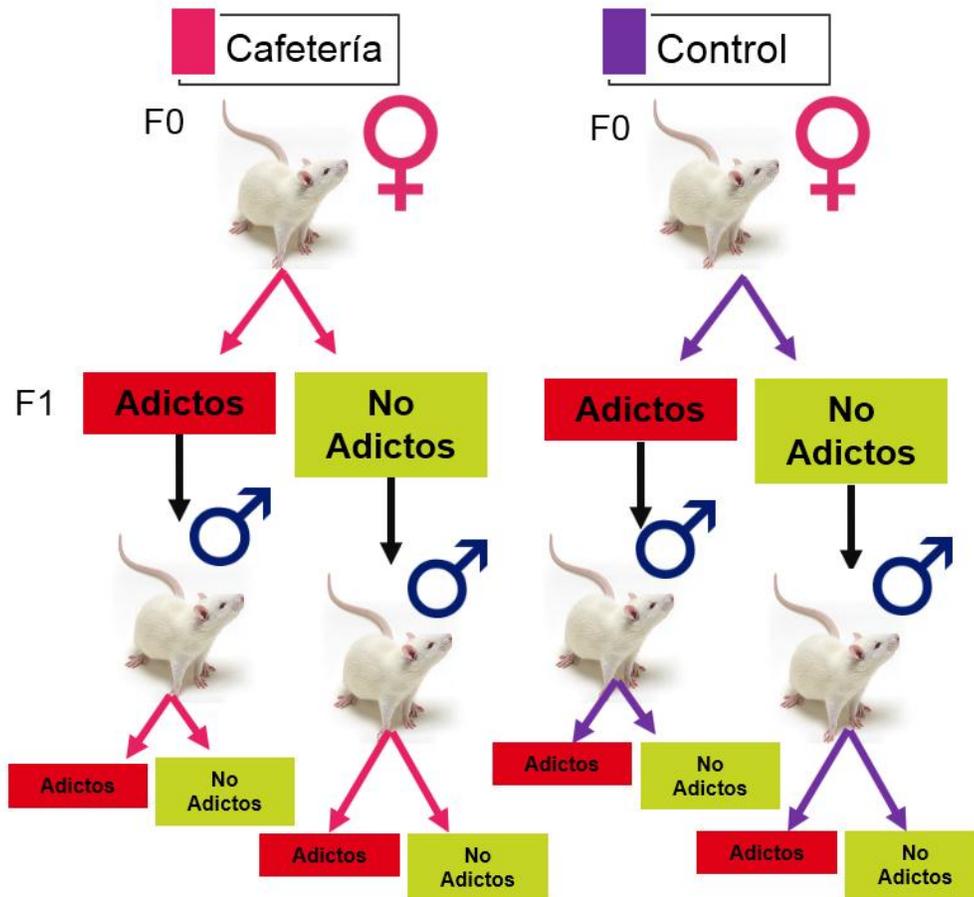
-Después de protocolo FR5: se expuso a comida estándar ad libitum.

-Después de protocolo PR: se expuso a comida estándar ad libitum.



**Figura 11.** Esquema de protocolo completo para el entrenamiento de condicionamiento operante en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.

6. Se generaron diversos grupos experimentales: grupos principales, los cuales conformaron la generación F0. La F1 se conformó por grupos de machos generados a partir de los grupos de la F0, después de ser subdivididos según la clasificación del comportamiento operante observado.



**Figura 12** Clasificación de grupos experimentales. Se seleccionaron de cada grupo de hembras (cafetería o control) si presentaban o no fenotipo semejante al adictivo. De manera similar se seleccionó a los machos F1 dependiendo del comportamiento

### **6.3.3 Obtención y almacenamiento de muestras**

1. Los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina posterior a cada entrenamiento
2. Se colectaron muestras de sangre aproximadamente 2ml por rata durante el sacrificio
3. Se obtuvieron cerebro completo y se colocara con hielo seco y se guardó a -80°C
4. Se obtuvo la región del NAc, siguiendo las coordenadas de localización de la región que se especifican en el “Mouse brain atlas” de Paxinos y Watson
5. Se colocaron en el tubo en hielo y se sometieron a sonicación empleando el sonicador Q125 para la extracción de RNA (1 ciclo de 15 segundos con una amplitud del 30% y pulso de 5).
6. Se realizó la purificación y obtención del RNA utilizando el kit: RNeasy Mini Kit de QIAGEN y siguiendo protocolos establecidos por el fabricante.
7. Se almacenó el RNA a -80°C hasta su posterior uso.

### **6.3.4 Cultivo Celular y Mantenimiento de la línea celular.**

1. Se utilizó la línea celular SIM-A9, la cual cada dos días se realiza recambio de medio.
2. Para realizar pase de células se utilizó la solución PBS/EDTA/EGTA/Glucosa.
3. Se realizó estandarización del tiempo de confluencia (80%) en flask de 25cm<sup>3</sup> para los posteriores experimentos.
4. Se sembraron 100,000 células por pozo en cajas de 6 pocillos a condiciones de medio de cultivo F-12 (10%SFB) 5% CO<sup>2</sup>
5. Se agregaron la concentración correspondiente de fármaco modulador (SAHA 100nM, AZA 75nM, SAM 250µM) y se pre-incubo durante 24 horas
6. Se estimularon células con Lipopolisacárido (LPS) 500ng/ml
7. Se realizó la incubación durante 6 horas y 24 horas con LPS para posteriormente realizar extracción de RNA con TRIzol.

### 6.3.5 Conteo Celular con Azul de Tripano y Siembra en Placa

Una vez alcanzada la confluencia, se les adicionó PBS 1X/EDTA 1mM/EGTA mM/Glucosa 1mg/ml a las células para desprender de la superficie, por un tiempo de 5-10 min, a 37 °C. Se recupera la suspensión celular en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó por 5 min a 400 g para obtener un botón de células, el cual se resuspendió en el volumen de medio apropiado descartando el sobrenadante de la centrifugación. De la suspensión celular se preparó una dilución (1:5) con azul de tripano, se mezcló perfectamente y se colocaron 10 µL en cámara de Neubauer para el conteo celular. Se contaron los cuatro cuadrantes de las esquinas. Se sacó un promedio, y se multiplicó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de Células/mL} = \text{Promedio de células} \times 5 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000$$

\*Se sembraron las células según el experimento a realizar.

### 6.3.6 Ensayo MTT

La reducción de MTT (3- [4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) hacia formazan por la reductasa mitocondrial es equivalente a la viabilidad celular.

1. Para determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos se sembraron 5000 células/pozo en placa de 96 pozos
2. Se utilizaron las instrucciones del Cell Proliferation Kit I (MTT) de Sigma Aldrich. Se agregaron 10µl de MTT (3- [4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) y se realizó una incubación de 4 horas a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, pasado este tiempo se agregaron 100µl de solución solubizadora (10% SDS en 0.01 M HCl) y se dejó toda la noche a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>.
3. Se realizó la lectura de absorbancia en el equipo GloMax® Discover a 600nm.

### 6.3.7 Extracción RNA

Para la extracción de ARN de la línea celular a los diferentes tiempos (6 horas y 24 horas) de incubación con los moduladores epigenéticos por el método de TRIzol, se añadió por pozo 1ml del reactivo frío, se homogenizó la muestra por pipeteo, esto se transfirió a un tubo de 1.5ml, y se incubó a TA por 5 minutos para permitir la disociación completa de nucleoproteínas. Posteriormente, se añadió 0.2ml de cloroformo frío. Se mezcló por Vortex por 30 segundos y se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregan 0.5 ml de isopropanol frío y se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche. Después, se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante, la pastilla de RNA se lavó con 0.5ml de etanol al 75% y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Este paso se repitió por dos lavados. La pastilla se resuspendió en 30 µl de Agua libre de RNAsas.

### 6.3.8 Retro-transcripción

Se realizó la RT-PCR para evaluar la expresión génica de las muestras. Primero en 10µl se agregaron 200ng de la respectiva muestra. Se preparó el máster mix con los siguientes componentes utilizando el kit *Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*:

Componente	Volumen
10X RT Buffer	2.0µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8µl
10X RT Random Primers	2.0µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0µl
RNase Inhibitor	1.0µl
Nuclease-free H2O	3.2µl

Ambas mezclas se juntaron para formar un volumen final de 20µl por reacción de RT. Se incubó en el equipo con la siguiente configuración:

	1	2	3	4
<b>Temperatura</b>	<b>25°C</b>	<b>37°C</b>	<b>85°C</b>	<b>4°C</b>
<b>Tiempo</b>	<b>10 minutos</b>	<b>120 minutos</b>	<b>5 minutos</b>	∞

### 6.3.9 PCR Tiempo Real

La química que se usa en la reacción es SYBR Green, con el estuche iQ™ SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad) utilizando 1µl del cDNA sintetizado. La cuantificación es relativa, utilizando el endógeno 36B4 como gen normalizador. Se utilizó el equipo LightCycler® 480 Instrument II.

Componente	Volumen
SYBR Green 2x	5µl
Primer 0.5µM	2µl
Agua	2µl
cDNA	1µl

Gen	Primer 1 (5-3)	Primer 2 (5-3)
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC C	TTGGTCAGCCACTCCTTC
IL-1β	GCAACTG TTCCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-1α	GCACCTTACACCTACCAGAGT	TGCAGGTCATTTAACCAAGTGG
TNF α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTCAGTAG
36B4	TCCAGGCTTTGGGCATCA	CTTTATCAGCTGCACATCACTCAG A

### **6.3.10 Extracción de DNA y RNA**

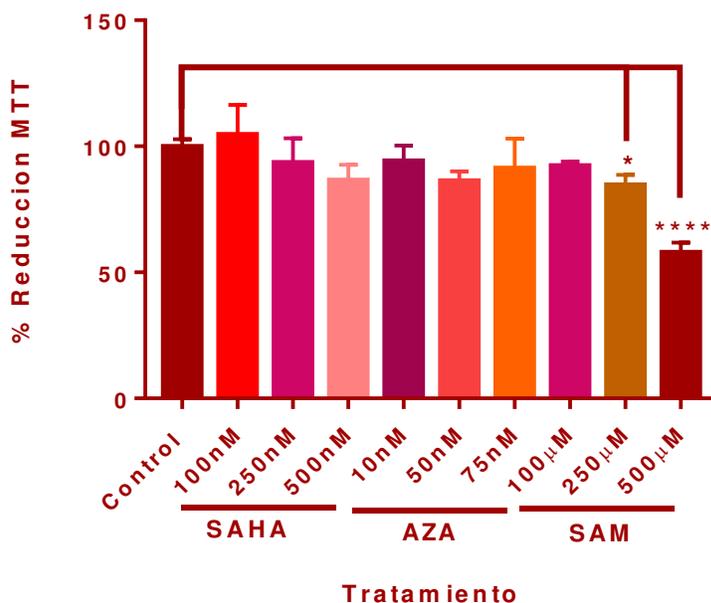
Los tejidos se lisaron y homogenizaron en buffer (RLT plus) que contiene isotiocianato de guanidina, el cual inactiva inmediatamente las ADNasas y ARNasas para asegurar la extracción de ADN y ARN intactos. Posteriormente, el lisado se pasó por una columna (AllPrep DNA spin column Qiagen, Venlo, Holanda) que junto con el buffer RLT plus, permite la fijación selectiva del ADN genómico. Después la columna se lavó con 500 µl del buffer AW1 y después con 500 µl del buffer AW2. Finalmente, el ADN se eluyó con 100 µl de buffer EB. El filtrado de la columna de ADN se recolectó y se le agregó un volumen de etanol al 70% para proveer las condiciones óptimas de fijación del ARN a la columna (RNeasy spin column) donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes fueron lavados con 700 y 500 µl de los buffers RW1 y RPE respectivamente. Finalmente, el ARN se eluyó con 30 µl de agua libre de RNAsas y ambos se almacenaron a -80°C.

## CAPITULO 7

### 7 Resultados

#### 7.1 Evaluación de la modulación farmacológica del perfil de metilación/acetilación del ADN en la activación de la microglia

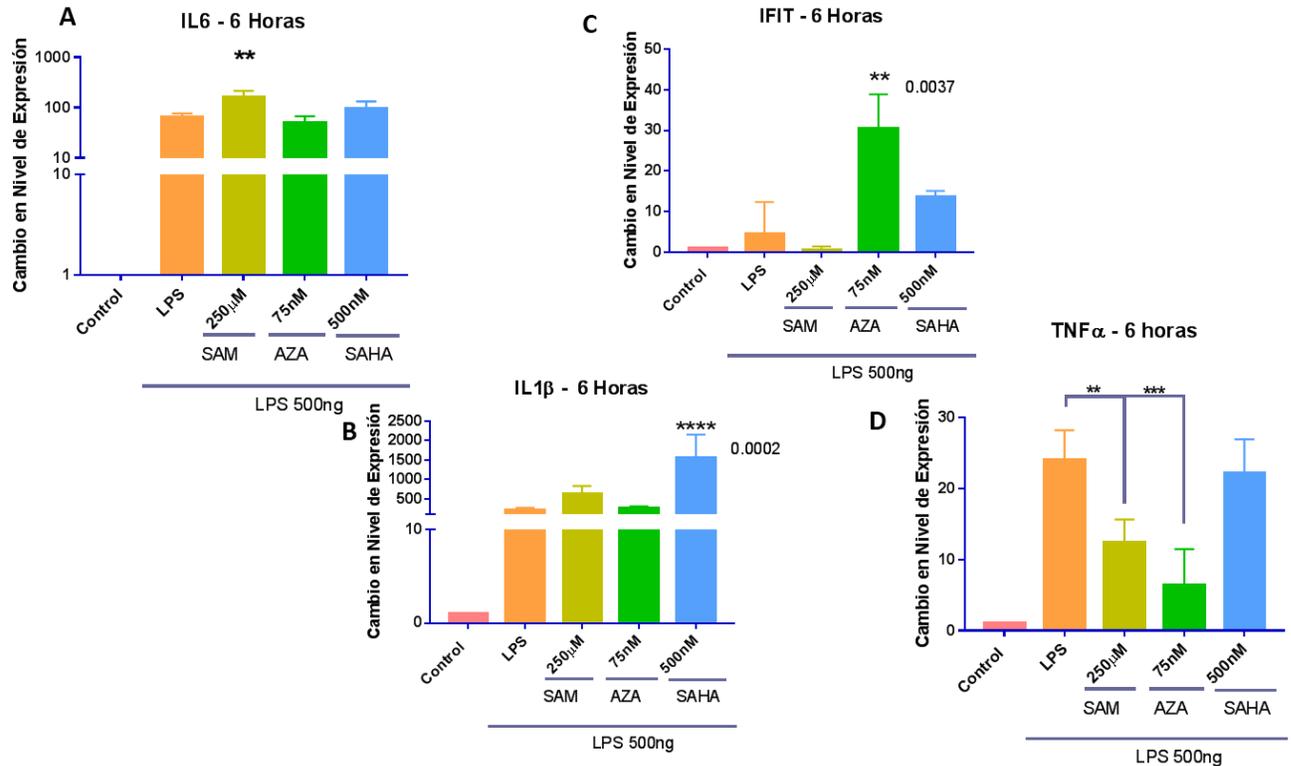
Se expusieron concentraciones crecientes de los fármacos (SAHA:100nM,250nM,500nM), (AZA:10nM,50nM,75nM), (SAM: 100µM,250µM,500µM) a las células de microglia SIM-A9 por 6h y 24h. Los resultados indican un efecto dosis dependiente de los fármacos en el porcentaje de reducción del MTT, evidenciándose que a concentraciones de SAM = 250µM, 500µM se observa una disminución significativa del 20%, indirectamente equivalente a una viabilidad cercana al 80%. Por su parte, el decremento del 20% en reducción del MTT se alcanza con AZA = 75nM y SAHA = 500nM (Figura. 13).



**Figura 13** Resultados de MTT absorbancia en 600nm, graficado como porcentaje de reducción del colorante MTT. Se utilizaron concentraciones crecientes de los 3 tratamientos. Dunnett's multiple comparisons test \*0.0332 \*\*0.0021 \*\*\*0.0002 \*\*\*\*<0.0001

## 7.2 Expresión de genes proinflamatorios por PCR Tiempo real

Empleamos PCR tiempo real para evaluar el efecto de candidatos potenciales de inflamación sobre los niveles de expresión de las citocinas proinflamatorias. En primera instancia, empleamos el lipopolisacárido (LPS) que promueve, en parte, la activación de la vía de TBK1 culminando en la activación corriente debajo de NFK $\beta$  y expresión de citocinas proinflamatorias. Los resultados confirman que la preincubación por 24 horas con SAHA 500nM, AZA 75nM, SAM250 $\mu$ M, modula selectivamente el perfil de expresión de citocinas 6h posteriores a la estimulación con LPS. En específico, la metilación inducida por SAM incrementa hasta el 292.09% comparado con LPS en IL-6 (Fig. 14A). No existen cambios referentes al inducido por LPS al preincubar con AZA y SAHA. Además, la activación de la metilación o no metilación por SAM o AZA decrecen el % hasta aproximadamente 48% y 28% respectivamente de la expresión del TNF $\alpha$  comparado con el promovido por LPS (Fig. 14D). No existen cambios referentes al inducido por LPS al preincubar con SAHA. De interés, la expresión de IL-1 $\beta$  es ampliamente sensible a la activación inducida por SAHA mostrando un incremento de alrededor del 600%, cuando se compara con el ejercido posterior a 6h con LPS (Fig. 14B). Finalmente, la expresión del IFIT1 aumenta hasta aproximadamente 577% en comparación con LPS en condiciones de inhibición de la metilación inducida por la preincubación de AZA (Fig. 14C).



**Figura 14:** Expresión génica con estimulación con 500 ng LPS por 6 horas. Cuantificación relativa por PCR en tiempo real, utilizando 36B4 como gen normalizador Dunnett's multiple comparisons test \*0.0332 \*\*0.0021 \*\*\*0.0002 \*\*\*\*<0.0001 A: niveles de expresión del gen IL-6 a 6 horas B: niveles de expresión del gen IL-1β a 24 horas B: niveles de expresión del gen IL-6 a 6 horas B: niveles de expresión del gen IL-6 a 24 horas C: niveles de expresión del gen IFIT a 6 horas D: niveles de expresión del gen TNFα a 6 horas.

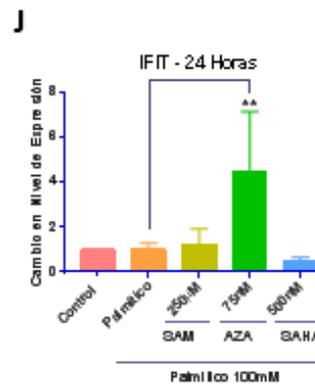
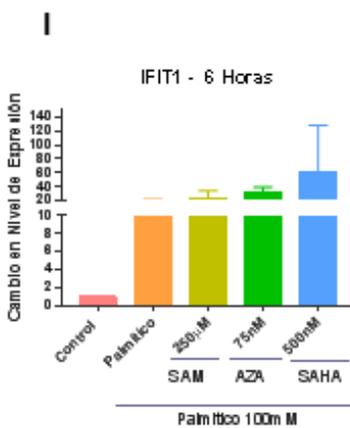
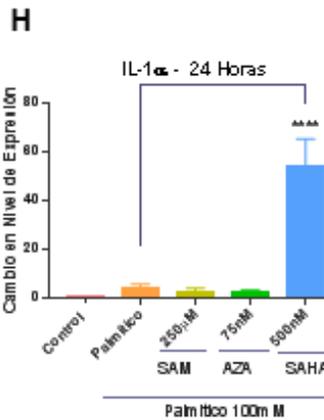
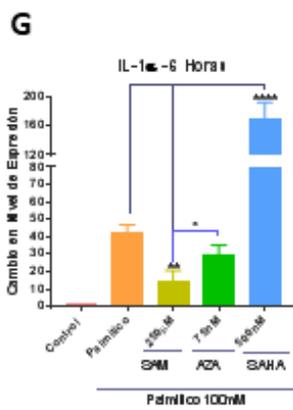
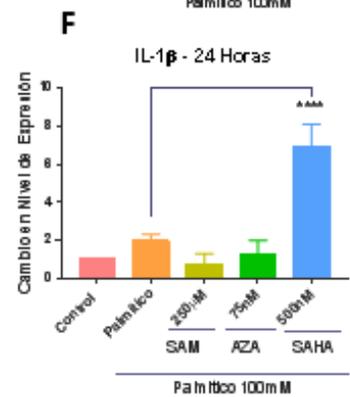
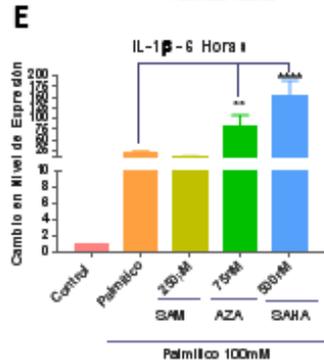
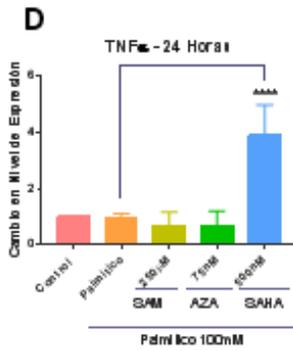
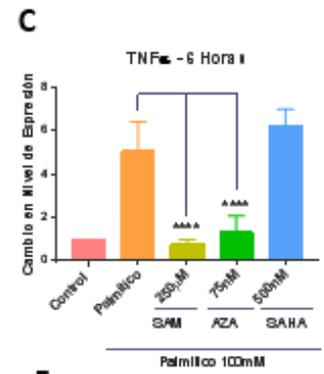
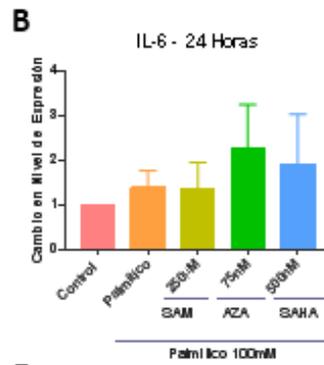
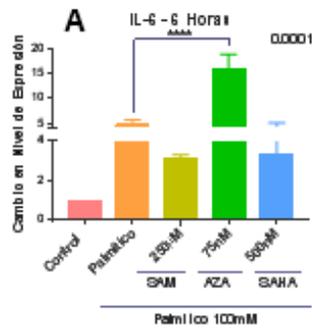
Con base en la evidencia identificada, mostrando que la expresión de las citocinas inflamatorias se modula por promotores/inhibidores de metilación y/o acetilación, en la siguiente serie de experimentos investigamos si la activación del perfil inflamatorio inducida por el ácido palmítico puede regularse a través de los fármacos de modulación epigenética antes mencionados.

Los resultados demuestran que la activación de la expresión de interleucina-6 a las 6h inducida con ácido palmítico (100mM) se exagera % al preincubar con AZA hasta 280% con respecto al PAL y se encuentra sin alteraciones a las 24h posteriores

de la activación con PAL (Fig. 15A, B). Similar al efecto mostrado durante la incubación con LPS, la activación de la metilación o no metilación por SAM o AZA, respectivamente, decrecen el % de la expresión del TNF $\alpha$  a las 6 h comparado con el promovido por PAL (Fig. 15C, D). De interés, la exacerbación de la expresión de TNF $\alpha$  a las 24h parece ser sensible totalmente a la acetilación regulada por SAHA, mostrando un % de incremento 395 respecto a la incubación con PAL ((Fig. 15C, D).

Por su parte, la promoción de no metilación y/o acetilación por la preincubación de AZA y SAHA, incrementa el porcentaje hasta 407.5 y 767.5 aproximadamente de incremento la expresión de la IL-1 $\beta$  a las 6 horas posteriores a la incubación con PAL (Fig. 15E, F), mientras que a las 24 h posteriores la inducción de acetilación promueve eficientemente la expresión de la IL-1 $\beta$  ((Fig. 15E, F). En el caso de la IL-1 $\alpha$ , la promoción o inhibición de la metilación por SAM o AZA, disminuye % hasta 34 y 70, mientras que la promoción de la acetilación por SAHA incrementa % hasta niveles de 357.14 con respecto a PAL en a expresión de la IL-1 $\alpha$  (Fig. 15G, H). El efecto de la acetilación sobre la expresión de la IL-1 $\alpha$  se favorece hasta las 24 h posteriores a la incubación con SAHA alcanzando % de 1256 más que el ácido palmítico (Fig. 15G, H).

Finalmente, no existe modulación en la expresión de IFIT1 ejercido por los moduladores de metilación o acetilación (SAM y AZA, SAHA, respectivamente), posterior a las 6h de incubación con PAL (Fig. 15I, J). Sin embargo, identificamos inhibición en la metilación inducida por AZA promueve incremento % de 444 en la expresión de IFIT1 a las 24 h posteriores a la incubación con PAL (Fig. 15I, J).

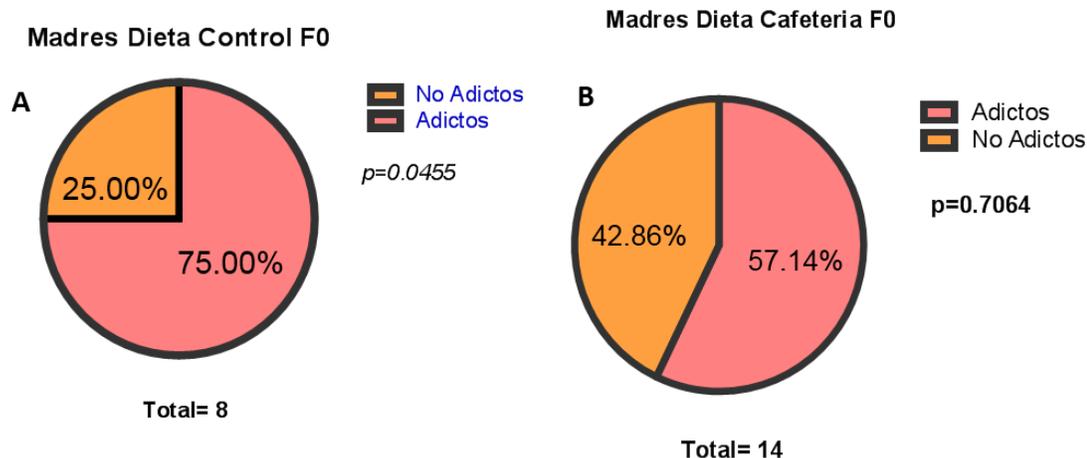


**Figura 15:** Expresión génica con estimulación con 100 mM PAL. Cuantificación relativa por PCR en tiempo real, utilizando 36B4 como gen normalizador Dunnett's multiple comparisons test \*0.0332 \*\*0.0021 \*\*\*0.0002 \*\*\*\*<0.0001 A: niveles de expresión del gen IL-6 a 6 horas B: niveles de expresión del gen IL-6 a 24 horas C : niveles de expresión del gen TNF $\alpha$  a 6 horas D: niveles de expresión del gen TNF $\alpha$  a 24 horas E:niveles de expresión del gen IL-1 $\beta$  a 6 horas F: niveles de expresión del gen IL-1 $\beta$  a 24 horas G: niveles de expresión del gen IL-1 $\alpha$  a 6 horas H: niveles de expresión del gen IL-1 $\alpha$  a 24 horas I: niveles de expresión del gen IFIT a 6 horas J: niveles de expresión del gen IFIT a 24 horas.

### **7.3 Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica hembras (F0), expuestas a dieta control y cafetería**

Para evaluar el comportamiento motivante (compulsivo-similar al adictivo), los sujetos se sometieron al protocolo de condicionamiento empleando los esquemas FR1 y FR5, y PR, como se describió anteriormente. Cabe señalar que los sujetos se clasificaron como adictos referentes al número de aciertos (liberación de la recompensa) en  $\geq 10$  en el protocolo PR. Todos los sujetos que no compartían este criterio de inclusión se consideraron como no adictos.

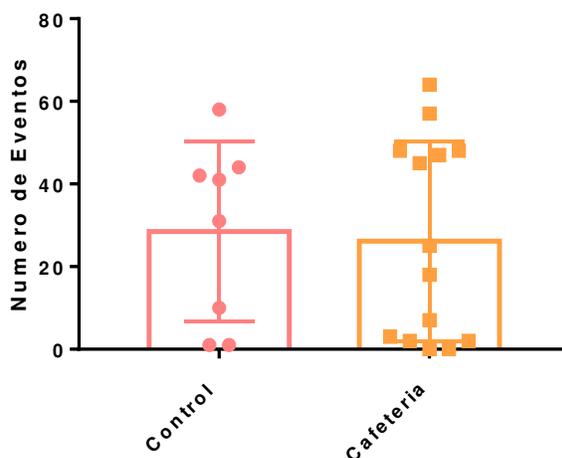
Los resultados demuestran que el 75% de las madres programadas con dieta control exhibe conducta de motivación comparado con 57.14% de madres que se expusieron a dieta de cafetería.



**Figura 16A:** Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (madres) adictas y no adictas, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=8; Chi2 con  $p < 0.05$ ). B: Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (madres) adictas y no adictas, expuestas a dieta cafetería; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=14; Chi2 con  $p < 0.05$ ).

Con respecto con los resultados obtenidos del grupo de hembras, alimentadas con dieta de cafetería se observa una disminución en el porcentaje de hembras adictas en comparación con las adictas de la dieta control, sin embargo, en este grupo de hembras no adictas y adictas, no se observa diferencia significativa.

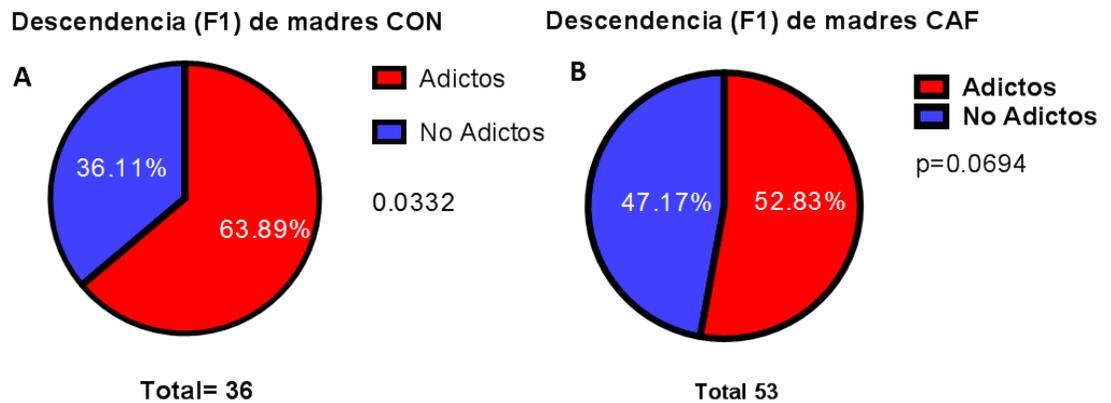
No se encontró diferencia significativa al comparar la totalidad de sujetos F0 en el número de eventos durante el protocolo PR.



**Figura 17** Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta control y cafetería; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR. Barras rosas Barras grises: machos F1 clasificados como no adictos. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; \*\*\* $p < 0.005$ )

#### 7.4 Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos F1, descendientes de hembras F0, expuestas a dieta de cafetería

Las madres expuestas a programación fetal por la ingesta de dieta de cafetería tienden a tener cantidad semejantes de descendientes que muestran el mismo fenotipo, con un porcentaje de 52.83% adictos y un 47.17% no adictos. Con respecto a los descendientes de madres con dieta control se obtuvo un porcentaje de 63.89% adictos y un 36.11% no adictos, por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa, siendo superior el porcentaje de adictos.



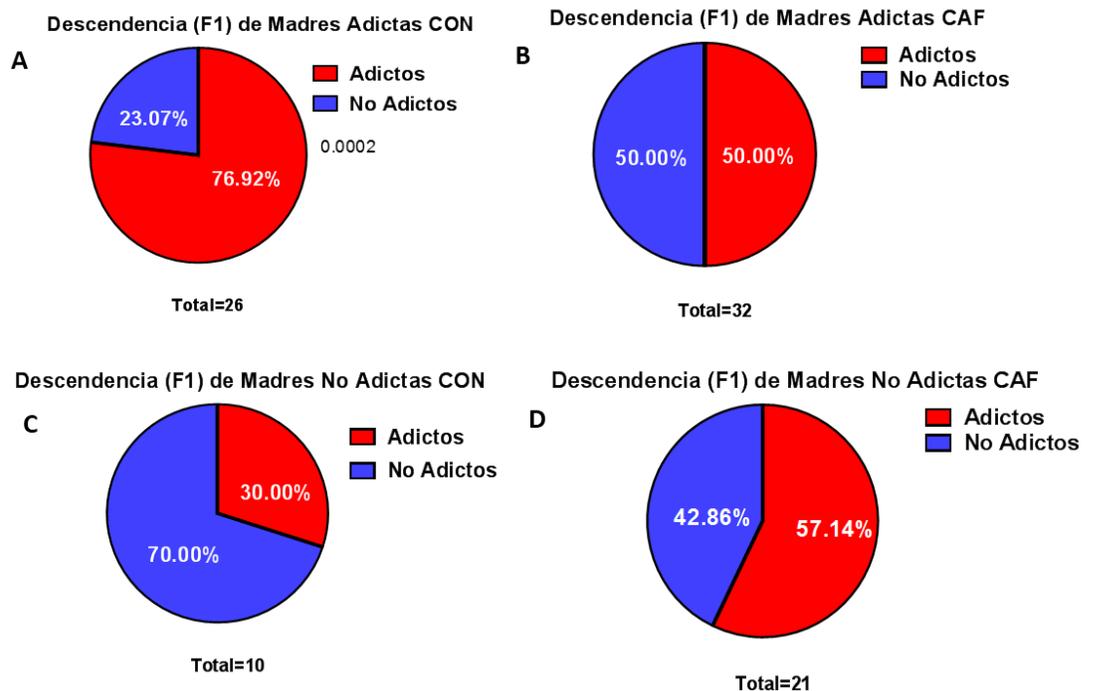
**Figura 18.A:** Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 adictos y no adictos, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=36; Chi2 con  $p < 0.05$ ). **B:** Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 adictos y no adictos, expuestas a dieta cafetería; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=53; Chi2 con  $p < 0.0694$ )

Cuando se realiza la separación en base al comportamiento de la madre y la exposición a dieta de cafetería se obtuvo que de madres adictas hay 50% adictos y 50% no adictos

en su descendencia. En contraste, las madres adictas de dieta control se obtuvo un 76.92% de adictos y un 23.07% de no adictos en la descendencia.

Por otro lado, cuando se analiza a la descendencia de madres que mostraron un comportamiento no adicto, en dieta control tenemos un 30% de adictos y un 70% de no adictos, por lo que el comportamiento de la madre influye en el número de descendientes que presentan un comportamiento no adicto y viceversa para la descendencia proveniente de madres adictas de dieta control.

Esto se contrasta de manera muy importante con los resultados de madres no adictas de cafetería, en donde se obtuvo un 57.14% adictos y 42.86% de no adictos, se observa un incremento significativo en el número de descendientes adictos en comparación con los de dieta control y más aun a pesar de que la madre presentara el fenotipo contrario.

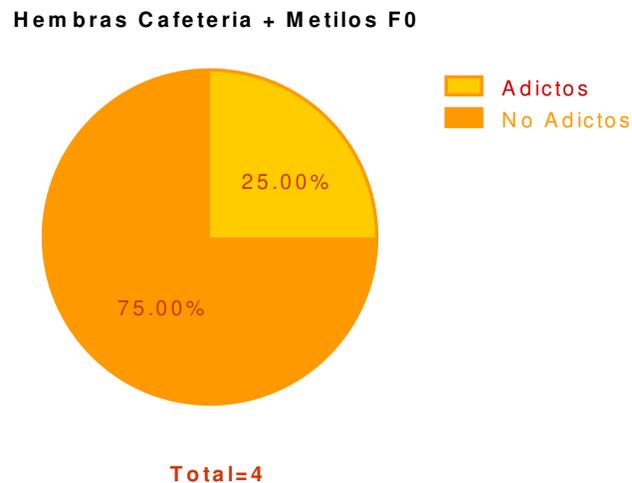


**Figura 19:** A: Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (no adictas y adictas) provenientes de madres adictas, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=26; Chi2 con  $p < 0.05$ ) B: Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (no

adictas y adictas) provenientes de madres adictas, expuestas a dieta cafetería; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=32; Chi2 con p=1) C: Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (no adictas y adictas) provenientes de madres no adictas, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=10; Chi2 con p< 0.05) D: Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (no adictas y adictas) provenientes de madres no adictas, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días(n=21)

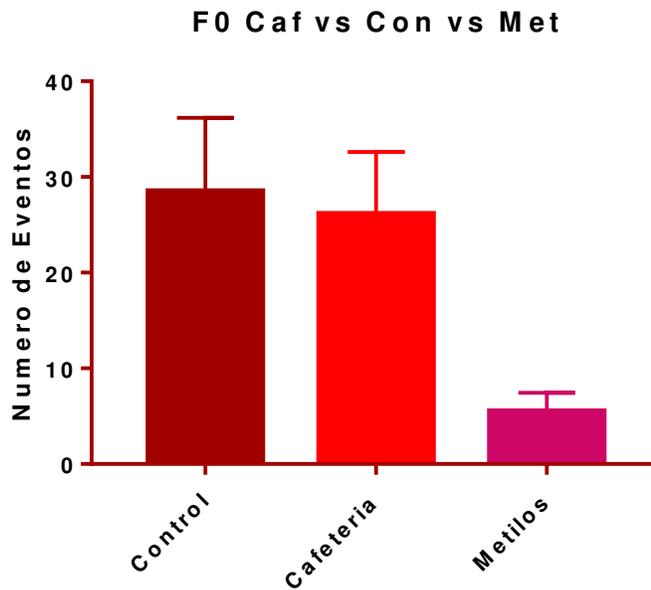
### 7.5 Confirmar si la modulación del metiloma revierte/exacerba el comportamiento similar a la adicción de la descendencia

En el grupo de hembras, alimentadas con dieta control suplementada con donadores de metilo, se observa una diferencia significativa entre el número de adictas y no adictas.



**Figura 20:** Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (madres) adictas y no adictas, expuestas a dieta cafetería suplementada con donadores metilo; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=4; Chi2 con p< 0.05).

Al analizar el promedio total del número de eventos en los 5 días del protocolo PR, observamos una importante disminución de estos en el grupo de cafetería suplementada con donadores de metilos.



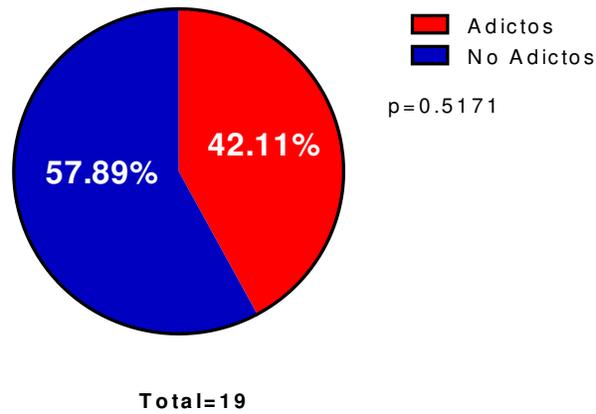
**Figura 21:** Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta control y cafetería; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR. (ANOVA de dos vías; \*\*\* $p < 0.005$ )

De igual manera al realizar una separación por comportamiento y dieta, notamos que de manera significativa hay una reducción del número de eventos en el protocolo PR en el grupo de dieta de metilos en comparación con adictos de cafetería y siendo su comportamiento similar a uno no adicto.

### **7.6 Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos F1, descendientes de hembras F0, expuestas a dieta de cafetería suplementada con donadores de metilo**

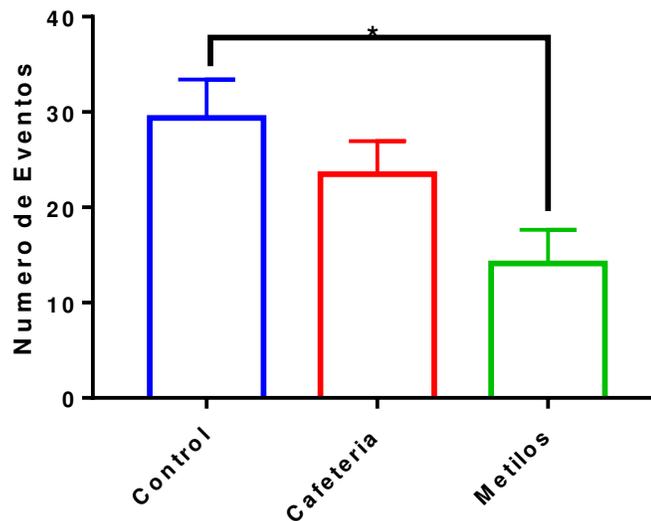
Se observó un incremento en el porcentaje total de madres con comportamiento no adicto en comparación al porcentaje de adictos de la población total de machos, siendo la diferencia entre estos no significativa.

### Descendencia (F1) de madres MET



**Figura 22:** Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (madres) adictas y no adictas, expuestas a dieta de cafetería suplementada con donadores de metilo; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=19 Chi2 con  $p < 0.05$ ).

Sin embargo, cuando se analiza el total de numero de eventos, identificamos una reducción significativa en el grupo de cafetería suplementada con metilos en comparación con el grupo control.



**Figura 23:** Gráfica de barras del número de eventos de la descendencia clasificadas: adictas y no adictas, por el protocolo PR con 5 días de duración expuestas a dieta control, cafetería y cafetería suplementada con donadores de metilo. (Sidak's multiple comparisons test;  $p = 0.0472$ )

## 7.7 Asignación de puntuación a comportamiento de machos F1, en base a protocolos FR5 y PR

Para la selección de los sujetos con mayor y menor motivación de los grupos evaluados, se utilizó el número de eventos del protocolo PR y se utilizó la siguiente formula:  $x = \frac{X_i - \bar{X}}{s.d}$  donde  $X_i$  es el valor de comportamiento para cada rata,  $\bar{X}$ , es el valor promedio de comportamiento de todo el grupo y s.d, la desviación estándar del grupo, esto se realizó para los valores obtenidos tanto del protocolo FR5 y PR y se graficó en base a ambos.

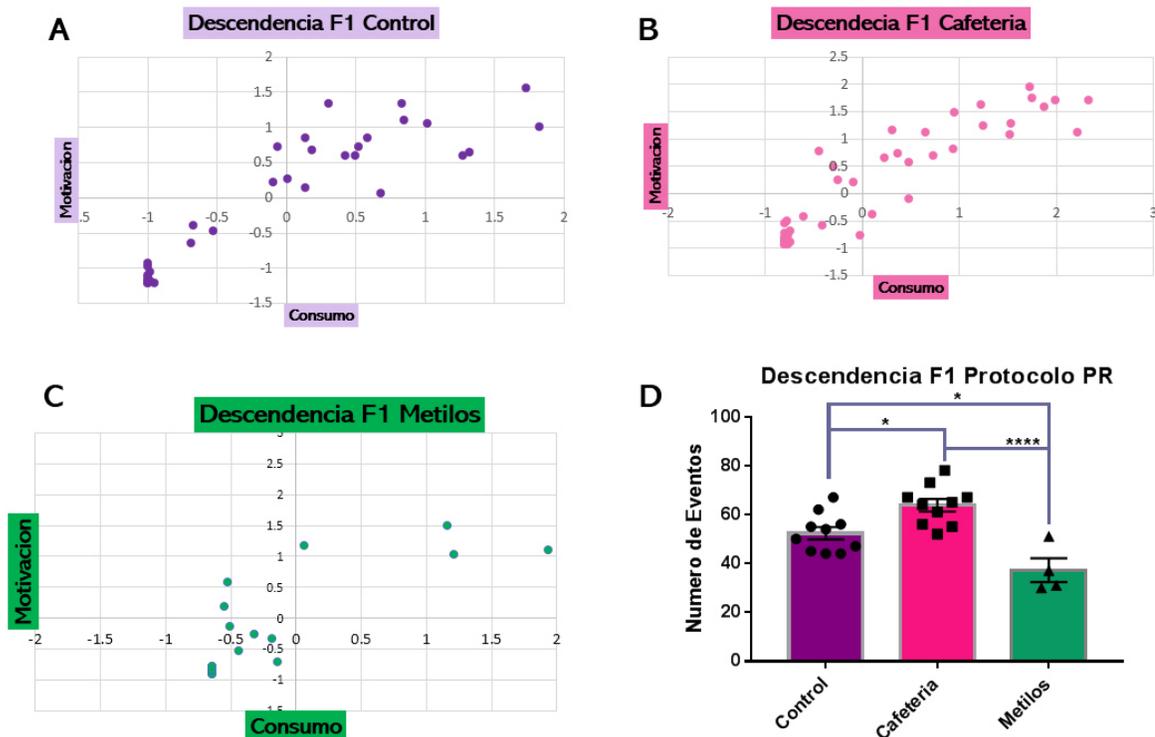
Podemos observar que tomando en cuenta los resultados de graficar FR5 y PR, se observa en los descendientes de madres alimentadas con dieta control que 10 sujetos se encuentran superando la puntuación de 0.5 en el cuadrante superior derecho, siendo estos los catalogados como adictos.

En el grupo de descendientes alimentados con dieta de cafetería, se repite el que haya un número elevado de sujetos designados como No Adictos por su distribución en la gráfica en el cuadrante inferior izquierdo, sin embargo, observamos un mayor número de sujetos que sobrepasan la puntuación de 0.5, siendo estos designados como Adictos.

Con respecto al grupo de descendientes alimentados con dieta de cafetería suplementada con donadores metilo, se observa una disminución en sujetos con motivación, dado que se aprecian mayor número de sujetos en la categoría de No Adictos, también notamos un aumento en el número de sujetos que se encuentran en la intersección de los cuadrantes por lo que no se clasifican como Adictos ni como No Adictos.

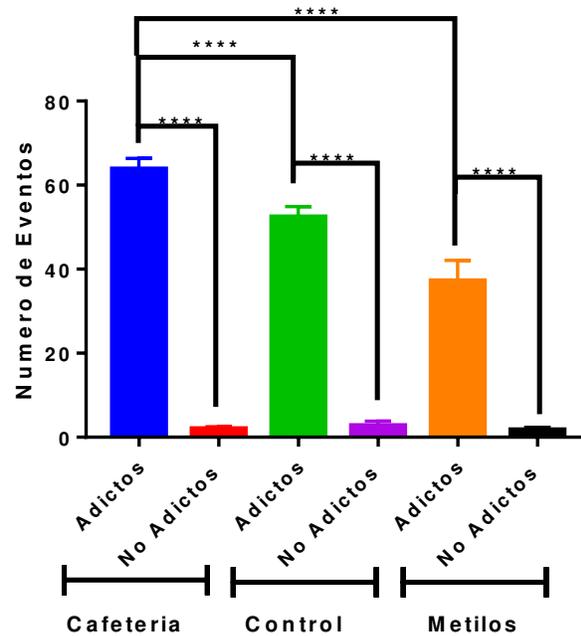
Además, utilizando el punto 0.5 al analizar el comportamiento en el protocolo PR de la descendencia F1, se observa una diferencia significativa entre el grupo de cafetería y grupo control, en donde se puede observar que la descendencia de madres alimentadas con dieta cafetería presenta una mayor motivación para obtener la recompensa respecto a la descendencia de madres control y cafetería suplementada con

donadores de metilo, lo cual puede verse reflejado a lo largo de los cinco días del protocolo PR.



**Figura 24:**Comportamiento de la descendencia: Gráfica de las puntuaciones para los aciertos y la motivación de cada rata. A: Dieta control, se calcularon de acuerdo con el desempeño en los protocolos FR5 y PR, y se representaron gráficamente. Las ratas con una puntuación de comportamiento mayor a 0.5 se designaron como Adicto y los del cuadrante inferior izquierdo como No Adicto B: Dieta cafetería, se calcularon de acuerdo con el desempeño en los protocolos FR5 y PR, y se representaron gráficamente. Las ratas con una puntuación de comportamiento mayor a 0.5 se designaron como Adicto y los del cuadrante inferior izquierdo como No Adicto. C: Dieta cafetería suplementada con donadores metilo, se calcularon de acuerdo con el desempeño en los protocolos FR5 y PR, y se representaron gráficamente. Las ratas con una puntuación de comportamiento mayor a 0.5 se designaron como Adicto y los del cuadrante inferior izquierdo como No Adicto. D: Gráfica de barras del número de eventos de la descendencia clasificadas: adictas y no adictas, por el protocolo PR con 5 días de duración expuestas a dieta control, cafetería y cafetería suplementada con donadores de metilo con puntuación.

Finalmente, al comparar el número de eventos de la descendencia de adictos programados con dieta de cafetería y dieta control, se observa que la programación con dieta de donadores de grupos metilo decrece el número de eventos totales. No se observan diferencias significativas en el número de eventos de la descendencia de sujetos no adictos.



**Figura 25:**Gráfica de barras del número de eventos entre descendencia clasificadas como A: adictas y NA: no adictas, por el protocolo PR con 5 días de duración expuestas a dieta control, cafetería y cafetería suplementada con donadores de metilo. (Tukey's multiple comparisons test;  $p=^* 0.0148$  \*  $0.0144^{****}$   $<0.0001$ )

## CAPITULO 8

### 8 Discusión

En este estudio se demostró que la programación fetal por exposición de dieta hipercalórica incrementa la conducta de motivación a la ingesta de comida calórica en la descendencia, recapitulando un fenotipo semejante a la adicción. De interés, identificamos que la promoción del perfil metilómico por ingesta de donadores de metilo durante la programación fetal, decrece eficientemente la conducta de motivación en la descendencia. Nuestros experimentos *in vitro* indican que la promoción del metiloma decrece la expresión de los genes TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  posteriores a la estimulación con estímulos proinflamatorios tales como el LPS y ácido palmítico. En su conjunto, proponemos que la programación fetal por dieta calórica incrementa la susceptibilidad a la conducta motivante y que pudiera bien estar correlacionado con la alteración de los genes TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  sensibles de ser modulados por cambios en el perfil metilómico.

En este trabajo sugerimos que la exposición de dieta calórica durante el embarazo y la lactancia programa a la descendencia a presentar incremento en la motivación por recompensas naturales. Inicialmente, identificamos que las madres (F0) control muestran mayor motivación para la obtención de la recompensa calórica que las madres programadas con dieta de cafetería. Contemplamos que esta conducta es posiblemente relacionada con el alto valor recompensante de la dieta calórica respecto al estímulo de la recompensa durante la prueba de Skinner. Este comportamiento correlaciona con reportes previos en donde se demuestra que sujetos sin exposición previa a dieta de cafetería, muestran mayor consumo de alimentos hipercalóricos (Ong & Muhlhausler, 2011). De interés, identificamos que a nivel poblacional el efecto de la programación fetal sobre la conducta motivante en la descendencia no parece tener diferencias significativas respecto al control, sin embargo, promueve la ubicación de 2 poblaciones de sujetos conductualmente diferentes. En este sentido, nuestro estudio

demuestra que la programación fetal incrementa el número total de sujetos con incremento en la motivación, a los que clasificamos como “adictos”, respecto a los sujetos con baja motivación, “no adictos”. Los resultados de este trabajo reafirman la propuesta que la programación fetal por dieta hipercalórica en los padres favorece el comportamiento motivante hacia la obtención de recompensas con alto valor calórico en la descendencia (Claycombe et al., 2015; Edlow, 2017),

Una de las propuestas que trata de explicar los efectos de la programación fetal en la conducta y metabolismo de la descendencia sugiere que durante este estado se promueve la activación de mecanismos epigenéticos. La epigenética coordina la interacción de factores externos y la integración de estos para promover una respuesta a lo largo de la vida del organismo e inclusive puede transmitirse a la descendencia. Durante la programación fetal, la epigenética contribuye a modular estados del desarrollo temprano que se acentúan y consolidan en la etapa adulta (Honegger & de Bivort, 2018). En el contexto de programación fetal de la conducta, se concibe que los mecanismos epigenéticos pueden ser un mecanismo molecular clave de los cambios duraderos en la plasticidad cerebral relacionada con la motivación-adicción. Sin embargo, no está del todo claro qué tipo de alteraciones epigenéticas pudieran estar vinculadas a la motivación para el consumo de alimento calórico, aunque en este contexto se conocen más específicamente las relacionadas con los efectos de la cocaína. Por ejemplo, entre las alteraciones epigenéticas más estudiadas en el contexto de adicción se encuentran la modificación de histonas y los cambios de metilación del ADN (Aagaard-Tillery et al., 2008; Cheray & Joseph, 2018; Masuyama & Hiramatsu, 2012; Urdinguio, Sanchez-Mut, & Esteller, 2009; Vaiserman & Koliada, 2017; Walker & Nestler, 2018).

Para identificar el papel de la regulación epigenética como un modulador activo en el desarrollo del fenotipo adictivo, empleamos un sistema *in vitro* para demostrar si la regulación del metiloma y/o acetiloma modula el perfil inflamatorio de la microglia. En nuestro estudio empleamos dos estrategias moleculares de activación inflamatoria, la incubación con LPS y con ácido palmítico (Fessler et al., 2009; N. Hu & Zhang, 2017). Los resultados indican que la estimulación con LPS o ácido palmítico favorece

el incremento de expresión de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IFIT1 quienes exacerban su expresión posterior a la estimulación con AZA. Similar a nuestros resultados, AZA aumenta significativamente la expresión de IL-6 e IL-8 en células de pulpa dental humana estimuladas con LPS (Mo, Li, Cai, Zhan, & Xu, 2019). Además, la estimulación con LPS durante 3 h en células polimorfonucleares, induce la desmetilación del gen IL-6 en los sitios CpG ubicados a - 302 y -264, y del gen sitio CpG TNF- $\alpha$  en la posición -371 (Shen et al., 2016).

En principio, aunque con reserva de confirmarse experimentalmente, proponemos que la modulación de la expresión de los genes de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IFIT1 identificada en nuestro modelo celular, pudiera estar relacionada a la modulación del metiloma en los sitios CpGs, que, en su mayoría, pero no únicos, se han identificado en la región del promotor de cada gen. En este sentido, la inducción de la metilación génica utilizando 100  $\mu$ mol/l SAM en macrófagos decrece la expresión de TNF- $\alpha$  y favorece la IL-10, posterior a la estimulación LPS (Pfalzer et al., 2014). Esto correlaciona con un incremento del 7% de la metilación global del ADN que regula 765 regiones metiladas diferencialmente asociadas con 918 genes (Pfalzer et al., 2014). En nuestro trabajo, desconocemos el porcentaje de metilación del DNA inducido por la estimulación de SAM en la línea celular de microglia a concentración de 250  $\mu$ mol/l, sin embargo, contemplamos la metilación de múltiples sitios CpGs, y que no necesariamente involucren a los genes de interés, sino a blancos que regulen negativa o positivamente la expresión génica de nuestros candidatos. Adicionalmente, existe evidencia de que la metilación no sólo modula la expresión génica a nivel de sitios CpGs, sino también se ha identificado a nivel de proteínas, utilizando tecnología de pirosecuenciación de bisulfito para determinar los niveles de metilación de cinco CpG (CpG1-5) en el promotor BDNF. Se encontraron asociaciones significativas entre la metilación de CpG5 y los fenotipos adictivos que incluyen tensión-ansiedad, ira-hostilidad, fatiga-inercia y depresión-deserción. Además, el ensayo de luciferasa mostró que el fragmento de ADN del promotor BDNF jugó un papel clave en la regulación de la expresión génica. (Xu et al., 2016)

Por su parte, aún no está del todo claro el efecto de la modulación de la acetilación del DNA/histonas empleando estrategias farmacológicas y su papel en la activación transcripcional del perfil inflamatorio en microglía. Recientemente, se demostró que la reducción de la HDAC2 decrece la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en microglía posterior a la estimulación con LPS (Jiao et al., 2018). Además, la estimulación de células BV2 con el inhibidor de la HDAC2, CAY10683, decrece los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sensible a LPS, e inclusive estos efectos decrecen la neuroinflamación de ratones (Jiao et al., 2018). Estos reportes contrastan con nuestros resultados en donde identificamos que la inhibición de la HDAC por SAHA favorece eficientemente la expresión de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$ . Una probable explicación a este efecto es el uso de líneas celulares diferentes, concentraciones, y empleo de inhibidores de las HDACs no específicos.

El mecanismo por el cual los ácidos grasos saturados de cadena larga desencadenan la inflamación sigue siendo polémico, sin embargo, los niveles de expresión de las citocinas muestran un patrón de expresión similar al inducido por LPS, sugiriendo que el efecto de los moduladores epigenéticos bien pudiera involucrar la vía TLR4. Evidencia experimental ha demostrado la contribución de la neuroinflamación en el desarrollo de patologías y trastornos del comportamiento, que incluyen la adicción a drogas (Harricharan, Abboussi, & Daniels, 2017; Kohno et al., 2019). En estudios previos del laboratorio identificamos por la tecnología de microarreglos de expresión que la región del NAc de sujetos con conducta motivante presentan un incremento en el gen IFIT1, el cual se activa corriente abajo de la vía del interferón alfa. En este contexto hipotetizamos que la programación fetal por dieta de cafetería podría potencialmente modular mecanismos epigenéticos que favorezcan la activación de la vía de interferón alfa en el NAc de la descendencia y favorezcan el desarrollo de adicción. Nuestros resultados *in vitro* comprueban que la probable desmetilación del ADN posterior a la estimulación con 5-AZA en cultivo de microglia, incrementa de manera notable la expresión de IFIT1, sugiriendo que la modulación de su promotor se favorece por el decremento en metilación. Con base en esta información, empleamos una dieta con donadores de grupos metilo con la finalidad de silenciar a la vía IFIT1 y genes potencialmente involucrados en el desarrollo de neuroinflamación, tales como

citocinas proinflamatorias secretadas por la microglia como IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-6. En un estudio reciente, se identificó que la administración de betaína a ratones redujo la expresión hepática de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-6 e incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Veskovic et al., 2019). De manera notable, nuestros resultados indican que la metilación del DNA o histonas decrece el comportamiento similar a la adicción en la descendencia de sujetos expuestos a programación fetal.

Estudios adicionales han demostrado que la exposición a dieta de donadores de metilo a padres promueve déficits en el aprendizaje y de memoria y alteración de la plasticidad sináptica del hipocampo Mat2a (Ryan et al., 2018). Adicionalmente, se demostró que una dieta deficiente en metilo (folato, metionina y colina) durante el período juvenil aumenta el comportamiento similar a la ansiedad y la memoria del miedo, acompañada de alteración en la expresión de genes como disminución en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus metilaciones en el hipocampo (Sahara et al., 2019; Y. Wang, Surzenko, Friday, & Zeisel, 2016). Adicionalmente, la promoción del metiloma también modula mecanismos moleculares que controlan el metabolismo y peso corporal. Por ejemplo, la suplementación de la dieta materna con donantes de metilo restaura el aumento de peso y promueve una mayor preferencia a la ingesta de comida grasa en animales expuestos a dieta calórica (Carlin, George, & Reyes, 2013). Además, estos efectos se correlacionan con la disminución en la expresión del receptor de opioides en el NAc genes del SNC como el transportador de dopamina e hipometilación global en la corteza prefrontal (Carlin et al., 2013). De interés, se ha reportado que la programación fetal por dieta alta en grasa promueve la hipometilación del ADN global en el circuito de recompensa de la descendencia (Carlin et al., 2013; Skinner et al., 2011). El decremento en la metilación del ADN global también se observa en respuesta a la programación por exposición ambiental a toxinas en etapas tempranas de vida (Baccarelli & Bollati, 2009), a la restricción de nutrientes en útero o la exposición prenatal a la cocaína (Novikova et al., 2008). De interés, el perfil de hipometilación en la PFC se revirtió tanto en hombres como en mujeres cuando la dieta materna se complementó con donantes de metilo (Carlin et al., 2013).

En su conjunto, nuestro trabajo contribuye a caracterizar el efecto de la programación fetal por nutrientes en el desarrollo de conductas motivantes. Con base en los experimentos *in vivo*, proponemos que la programación nutricional materna induce cambios en el metiloma de genes vinculados a la conducta motivante en la descendencia. Con base en nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo*, también proponemos que el metiloma favorece la expresión de la vía IFIT1 en el NAc de la descendencia.

## **CAPITULO 9**

### **9 Conclusiones**

- En condiciones de estimulación con LPS y ácido palmítico, la expresión de IL-6 y IL-1 $\beta$ , se modula por metilación y acetilación, respectivamente.
- La hipometilación modula positivamente la expresión de IFIT posterior a la estimulación con LPS y ácido palmítico.
- La dieta de cafetería incrementa la susceptibilidad de la descendencia a presentar un fenotipo similar a la adicción.
- La dieta de cafetería suplementada con donadores de metilo disminuye la motivación de la descendencia a presentar comportamiento adictivo

## CAPITULO 10

### 10 Referencias:

- Aagaard-Tillery, K. M., Grove, K., Bishop, J., Ke, X., Fu, Q., McKnight, R., & Lane, R. H. (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: Maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *Journal of Molecular Endocrinology*.  
<https://doi.org/10.1677/JME-08-0025>
- Abdanipour, A., Schluesener, H. J., & Tiraihi, T. (2012). Effects of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on improvement of locomotor function in rat spinal cord injury based on epigenetic science. *Iranian Biomedical Journal*. <https://doi.org/10.6091/ibj.1060.2012>
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I., & Guerri, C. (2010). Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010>
- Anderson, E. M., Penrod, R. D., Barry, S. M., Hughes, B. W., Taniguchi, M., & Cowan, C. W. (2018). It's a complex issue: Emerging connections between epigenetic regulators in drug addiction. *European Journal of Neuroscience*, 0–2. <https://doi.org/10.1111/ejn.14170>
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, N., & Skinner, M. K. (2005). Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- Arcego, D. M., Toniazzo, A. P., Krolow, R., Lampert, C., Berlitz, C., dos Santos Garcia, E., ... Dalmaz, C. (2018). Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. *Molecular Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0538-y>
- Arroyo, K., & Herron, D. M. (2013). The epidemiology of obesity. In *Bariatric Endoscopy*.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1710-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1710-2_1)
- Ávalos, Y., Kerr, B., Maliqueo, M., & Dorfman, M. (2018). Cell and molecular mechanisms behind diet-induced hypothalamic inflammation and obesity. *Journal of Neuroendocrinology*.  
<https://doi.org/10.1111/jne.12598>
- Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2008). Underweight rats have enhanced dopamine release and blunted acetylcholine response in the nucleus accumbens while bingeing on sucrose. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.017>
- Baccarelli, A., & Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in*

*Pediatrics.*

- Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., McCarthy, M. M., ... Nestler, E. J. (2010). Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biological Psychiatry*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.028>
- Bayarsaihan, D. (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of Dental Research*.  
<https://doi.org/10.1177/0022034510378683>
- Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.09-144014>
- Biliński, P., Wojtyła, A., Kapka-Skrzypczak, L., Chwedorowicz, R., Cyranka, M., & Studziński, T. (2012). Epigenetic regulation in drug addiction. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*.
- Block, T., & El-Osta, A. (2017). Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis*. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.003>
- Bohacek, J., & Mansuy, I. M. (2015). Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3964>
- Camacho, A. (2017). Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in offspring. *Behavioural Brain Research*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.014>
- Campos, E. I., & Reinberg, D. (2009). Histones: Annotating Chromatin. *Annual Review of Genetics*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.032608.103928>
- Caputi, F. F., Palmisano, M., Carboni, L., Candeletti, S., & Romualdi, P. (2016). Opioid gene expression changes and post-translational histone modifications at promoter regions in the rat nucleus accumbens after acute and repeated 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) exposure. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.023>
- Carlin, J. L., George, R., & Reyes, T. M. (2013). Methyl Donor Supplementation Blocks the Adverse Effects of Maternal High Fat Diet on Offspring Physiology. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063549>
- Cedergren, M. I. (2004). Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000107291.46159.00>
- Cheng, C., Huang, C., Ma, T. T., Bian, E. B., He, Y., Zhang, L., & Li, J. (2014). SOCS1 hypermethylation mediated by DNMT1 is associated with lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophages. *Toxicology Letters*.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.12.023>

- Cheng, X., & Blumenthal, R. M. (2010). Coordinated chromatin control: Structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi100213t>
- Cheray, M., & Joseph, B. (2018). Epigenetics Control Microglia Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00243>
- Cho, S.-H., Chen, J. A., Sayed, F., Ward, M. E., Gao, F., Nguyen, T. A., ... Gan, L. (2015). SIRT1 Deficiency in Microglia Contributes to Cognitive Decline in Aging and Neurodegeneration via Epigenetic Regulation of IL-1 . *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2939-14.2015>
- Choo, Q. Y., Ho, P. C., Tanaka, Y., & Lin, H. S. (2010). Histone deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA induced growth arrest and suppressed lipopolysaccharide-stimulated NF-KB p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11 cells. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq108>
- Claycombe, K. J., Brissette, C. A., & Ghribi, O. (2015). Epigenetics of Inflammation, Maternal Infection, and Nutrition. *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.3945/jn.114.194639>
- Conradt, E., Adkins, D. E., Crowell, S. E., Raby, K. L., Diamond, L. M., & Ellis, B. (2018). Incorporating epigenetic mechanisms to advance fetal programming theories. *Development and Psychopathology*. <https://doi.org/10.1017/S0954579418000469>
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Czeh, M., Gressens, P., & Kaindl, A. M. (2011). The yin and yang of microglia. *Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1159/000328989>
- D'Addario, C., Di Francesco, A., Pucci, M., Finazzi Agrò, A., & MacCarrone, M. (2013). Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signalling. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.12125>
- Das, A., Chai, J. C., Kim, S. H., Lee, Y. S., Park, K. S., Jung, K. H., & Chai, Y. G. (2015). Transcriptome sequencing of microglial cells stimulated with TLR3 and TLR4 ligands. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1728-5>
- Dávila-Torres, J., González-Izquierdo, J. J., & Barrera-Cruz, A. (2015). [Obesity in Mexico]. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*.
- Dong, M., Zheng, Q., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W., & Ren, J. (2013). Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.08.023>

- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International Journal of Molecular Sciences*.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- Edlow, A. G. (2017). Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. *Prenatal Diagnosis*. <https://doi.org/10.1002/pd.4932>
- Elvir, L., Duclot, F., Wang, Z., & Kabbaj, M. (2017). Epigenetic regulation of motivated behaviors by histone deacetylase inhibitors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.030>
- Ersche, K. D., Jones, P. S., Williams, G. B., Robbins, T. W., & Bullmore, E. T. (2013). Cocaine dependence: A fast-track for brain ageing. *Molecular Psychiatry*.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.31>
- Fessler, M. B., Rudel, L. L., & Brown, J. M. (2009). Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology*.  
<https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832fa5c4>
- Fleiss, B., Nilsson, M. K. L., Blomgren, K., & Mallard, C. (2012). Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitized neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-70>
- Forbes, E. E., & Dahl, R. E. (2012). Research Review: Altered reward function in adolescent depression: What, when and how? *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2011.02477.x>
- Fu, Q., Olson, P., Rasmussen, D., Keith, B., Williamson, M., Zhang, K. K., & Xie, L. (2016). A short-term transition from a high-fat diet to a normal-fat diet before pregnancy exacerbates female mouse offspring obesity. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.236>
- Gangarossa, G., Espallergues, J., de Kerchove d'Exaerde, A., El Mestikawy, S., Gerfen, C. R., Hervé, D., ... Valjent, E. (2013). Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Frontiers in Neural Circuits*.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00022>
- Garden, G. A. (2013). Epigenetics and the Modulation of Neuroinflammation. *Neurotherapeutics*.  
<https://doi.org/10.1007/s13311-013-0207-4>
- Gearhardt, A. N., White, M. A., Masheb, R. M., Morgan, P. T., Crosby, R. D., & Grilo, C. M. (2012). An examination of the food addiction construct in obese patients with binge eating disorder. *International Journal of Eating Disorders*. <https://doi.org/10.1002/eat.20957>

- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Ghavifekr Fakhr, M., Farshdousti Hagh, M., Shanebandi, D., & Baradaran, B. (2013). DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. *Genetics Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/317569>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J. S., Wang, W. Y., Seo, J., Hennig, K. M., ... Tsai, L. H. (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10849>
- Guo, T., Chang, L., Xiao, Y., & Liu, Q. (2015). S-adenosyl-L-methionine for the treatment of chronic liver disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122124>
- Gutiérrez-Martos, M., Girard, B., Mendonça-Netto, S., Perroy, J., Valjent, E., Maldonado, R., & Martin, M. (2018). Cafeteria diet induces neuroplastic modifications in the nucleus accumbens mediated by microglia activation. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12541>
- Hamazaki, K., Maekawa, M., Toyota, T., Dean, B., Hamazaki, T., & Yoshikawa, T. (2015). Fatty acid composition of the postmortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Psychiatry Research*. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.01.004>
- Hao, X., Huang, Y., Qiu, M., Yin, C., Ren, H., Gan, H., ... Angres, I. A. (2016). Immunoassay of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine: the methylation index as a biomarker for disease and health status. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2296-8>
- Harricharan, R., Abboussi, O., & Daniels, W. M. U. (2017). Addiction: A dysregulation of satiety and inflammatory processes. *Progress in Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.07.012>
- Hebebranda, J., Albayraka, Ö., Adanb, R., Antel, J., Dieguezc, C., De Jongb, J., ... Dickson, S. L. (2014). “Eating addiction”, rather than “food addiction”, better captures addictive-like eating behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.016>
- Hermann, A., Gowher, H., & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4201-1>

- Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cellular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>
- Hoeijmakers, L., Lucassen, P. J., & Korosi, A. (2015). The interplay of early-life stress, nutrition, and immune activation programs adult hippocampal structure and function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00103>
- Honegger, K., & de Bivort, B. (2018). Stochasticity, individuality and behavior. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.058>
- Hsing, C. H., Hung, S. K., Chen, Y. C., Wei, T. S., Sun, D. P., Wang, J. J., & Yeh, C. H. (2015). Histone deacetylase inhibitor trichostatin ameliorated endotoxin-induced neuroinflammation and cognitive dysfunction. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2015/163140>
- Hu, J.-L., Zhou, B. O., Zhang, R.-R., Zhang, K.-L., Zhou, J.-Q., & Xu, G.-L. (2009). The N-terminus of histone H3 is required for de novo DNA methylation in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905767106>
- Hu, N., & Zhang, Y. (2017). TLR4 knockout attenuated high fat diet-induced cardiac dysfunction via NF- $\kappa$ B/JNK-dependent activation of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 2001–2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.010>
- Hu, Q. P., & Mao, D. A. (2016). Histone deacetylase inhibitor SAHA attenuates post-seizure hippocampal microglia TLR4/MYD88 signaling and inhibits TLR4 gene expression via histone acetylation. *BMC Neuroscience*. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0264-9>
- Hyman, S., Malenka, R., Nestler, E., Sydor, A., & Brown, R. (2009). *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, Second Edition. Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience (2nd ed.)*.
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands - "A rough guide." *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>
- Iurescia, S., Seripa, D., & Rinaldi, M. (2016). Looking Beyond the 5-HTTLPR Polymorphism: Genetic and Epigenetic Layers of Regulation Affecting the Serotonin Transporter Gene Expression. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0304-6>
- Izaola, O., de Luis, D., Sajoux, I., Domingo, J. C., & Vidal, M. (2015). Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). *Nutricion Hospitalaria*. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829>
- Jiao, F. Z., Wang, Y., Zhang, H. Y., Zhang, W. bin, Wang, L. W., & Gong, Z. J. (2018). Histone Deacetylase 2 Inhibitor CAY10683 Alleviates Lipopolysaccharide Induced Neuroinflammation Through Attenuating TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Neurochemical Research*, 0(0), 1–10.

<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2532-9>

- Jones, P. A., & Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2651>
- Jung, K. H., Das, A., Chai, J. C., Kim, S. H., Morya, N., Park, K. S., ... Chai, Y. G. (2015). RNA sequencing reveals distinct mechanisms underlying BET inhibitor JQ1-mediated modulation of the LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0260-5>
- Kai, Y., Li, Y., Sun, T., Yin, W., Mao, Y., Li, J., ... Tao, W. (2018). A medial prefrontal cortex-nucleus accumbens corticotropin-releasing factor circuitry for neuropathic pain-increased susceptibility to opioid reward. *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0152-4>
- Kannan, V., Brouwer, N., Hanisch, U. K., Regen, T., Eggen, B. J. L., & Boddeke, H. W. G. M. (2013). Histone deacetylase inhibitors suppress immune activation in primary mouse microglia. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.23221>
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C. S., Reynolds, K., & He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>
- Kenny, P. J. (2011). Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.016>
- Kereliuk, S. M., Brawerman, G. M., & Dolinsky, V. W. (2017). Maternal macronutrient consumption and the developmental origins of metabolic disease in the offspring. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18071451>
- Kohno, M., Link, J., Dennis, L. E., McCreedy, H., Huckans, M., Hoffman, W. F., & Loftis, J. M. (2019). Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.01.007>
- Koob, G. F. (2013). Negative reinforcement in drug addiction: The darkness within. *Current Opinion in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.03.011>
- Kumar, A., Choi, K. H., Renthal, W., Tsankova, N. M., Theobald, D. E. H., Truong, H. T., ... Nestler, E. J. (2005). Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.023>
- Kumar, P., Gogulamudi, V. R., Periasamy, R., Raghavaraju, G., Subramanian, U., & Pandey, K. N. (2017). Inhibition of HDAC enhances STAT acetylation, blocks NF- $\kappa$ B, and suppresses the

- renal inflammation and fibrosis in Npr1 haplotype male mice . *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00166.2017>
- Land, B. B., & DiLeone, R. J. (2012). Losing the Lust for Life: A New Role for an Old Feeding Peptide? *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.018>
- Lecoutre, S., Oger, F., Pourpe, C., Butruille, L., Marousez, L., Dickes-coopman, A., ... Breton, C. (2017). Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Molecular Metabolism*, 6(8), 922–930. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.05.010>
- Leigh, S. J., & Morris, M. J. (2018). The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. *Biological Psychology*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2016.12.013>
- Lillycrop, K. A., Phillips, E. S., Torrens, C., Hanson, M. A., Jackson, A. A., & Burdge, G. C. (2008). Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR $\alpha$  promoter of the offspring. *British Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1017/S0007114507894438>
- Macedo, F., Souza, L., Glezer, I., & Gaspar, J. M. (2019). Brain Innate Immune Response in Diet-Induced Obesity as a Paradigm for Metabolic Influence on Inflammatory Signaling, 13(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00342>
- Martin, T. A., Jayanthi, S., McCoy, M. T., Brannock, C., Ladenheim, B., Garrett, T., ... Cadet, J. L. (2012). Methamphetamine causes differential alterations in gene expression and patterns of histone acetylation/hypoacetylation in the rat nucleus accumbens. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034236>
- Massart, R., Barnea, R., Dikshtein, Y., Suderman, M., Meir, O., Hallett, M., ... Yadid, G. (2015). Role of DNA Methylation in the Nucleus Accumbens in Incubation of Cocaine Craving. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3053-14.2015>
- Masuyama, H., & Hiramatsu, Y. (2012). Effects of a high-fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expression. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2161>
- Masuyama, H., Mitsui, T., Eguchi, T., Tamada, S., & Hiramatsu, Y. (2016). The effects of paternal high-fat diet exposure on offspring metabolism with epigenetic changes in the mouse *adiponectin* and *leptin* gene promoters. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00095.2016>
- Masuyama, H., Mitsui, T., Nobumoto, E., & Hiramatsu, Y. (2015). The effects of high-fat diet exposure in utero on the obesogenic and diabetogenic traits through epigenetic changes in

- Adiponectin and Leptin gene expression for multiple generations in female mice. *Endocrinology*.  
<https://doi.org/10.1210/en.2014-2020>
- Matt, S. M., Lawson, M. A., & Johnson, R. W. (2016). Aging and peripheral lipopolysaccharide can modulate epigenetic regulators and decrease IL-1 $\beta$  promoter DNA methylation in microglia. *Neurobiology of Aging*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.006>
- McCabe, M. T., Brandes, J. C., & Vertino, P. M. (2009). Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2784>
- McNaull, B. B. A., Todd, S., McGuinness, B., & Passmore, A. P. (2010). Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease - A mini-review. *Gerontology*.  
<https://doi.org/10.1159/000237873>
- Mechawar, N., & Savitz, J. (2016). Neuropathology of mood disorders: do we see the stigmata of inflammation? *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.212>
- Melo, H. M., Santos, L. E., & Ferreira, S. T. (2019). Diet-Derived Fatty Acids, Brain Inflammation, and Mental Health. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(March), 1–12.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00265>
- Meredith, G. E., Baldo, B. A., Andrezjewski, M. E., & Kelley, A. E. (2008). The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Structure and Function*.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-008-0175-3>
- Merson, T. D., Binder, M. D., & Kilpatrick, T. J. (2010). Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. *NeuroMolecular Medicine*.  
<https://doi.org/10.1007/s12017-010-8112-z>
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., ... Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06008>
- Mo, Z., Li, Q., Cai, L., Zhan, M., & Xu, Q. (2019). The effect of DNA methylation on the miRNA expression pattern in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in human dental pulp cells. *Molecular Immunology*, *111*(February), 11–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.03.012>
- Mohammadi, A., Sharifi, A., Pourpaknia, R., Mohammadian, S., & Sahebkar, A. (2018). Manipulating macrophage polarization and function using classical HDAC inhibitors: Implications for autoimmunity and inflammation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.009>

- 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*. <https://doi.org/10.1155/2018/8061389>
- Mychasiuk, R., Muhammad, A., Ilnytsky, S., & Kolb, B. (2013). Persistent gene expression changes in NAc, mPFC, and OFC associated with previous nicotine or amphetamine exposure. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.006>
- Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., & Ungless, M. A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046>
- Nennig, S. E., & Schank, J. R. (2017). The role of NFkB in drug addiction: Beyond inflammation. *Alcohol and Alcoholism*. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agw098>
- Novikova, S. I., He, F., Bai, J., Cutrufello, N. J., Lidow, M. S., & Undieh, A. S. (2008). Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001919>
- Ong, Z. Y., & Muhlhausler, B. S. (2011). Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.10-178392>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., ... Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Paolicelli, R. C., & Ferretti, M. T. (2017). Function and dysfunction of microglia during brain development: Consequences for synapses and neural circuits. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2017.00009>
- Pascual, M., Baliño, P., Alfonso-Loeches, S., Aragón, C. M. G., & Guerri, C. (2011). Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.012>
- Patel, U., Rajasingh, S., Samanta, S., Cao, T., Dawn, B., & Rajasingh, J. (2017). Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.006>
- Pedram, P., Wadden, D., Amini, P., Gulliver, W., Randell, E., Cahill, F., ... Sun, G. (2013). Food Addiction: Its Prevalence and Significant Association with Obesity in the General Population.

*PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074832>

- Pfalzer, A. C., Choi, S.-W., Tammen, S. A., Park, L. K., Bottiglieri, T., Parnell, L. D., & Lamon-Fava, S. (2014). S-adenosylmethionine mediates inhibition of inflammatory response and changes in DNA methylation in human macrophages. *Physiological Genomics*.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00056.2014>
- Regina, M., Korhonen, V. P., Smith, T. K., Alakuijala, L., & Eloranta, T. O. (1993). Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: Prevention by dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1083>
- Rinaman, L. (2010). Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Research*.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.059>
- Rottach, A., Frauer, C., Pichler, G., Bonapace, I. M., Spada, F., & Leonhardt, H. (2009). The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1152>
- Ryan, D. P., Henzel, K. S., Pearson, B. L., Siwek, M. E., Papazoglou, A., Guo, L., ... Ehninger, D. (2018). A paternal methyl donor-rich diet altered cognitive and neural functions in offspring mice. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.53>
- Saddoris, M. P., Sugam, J. A., Cacciapaglia, F., & Carelli, R. M. (2013). Rapid dopamine dynamics in the accumbens core and shell: learning and action. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Sahara, Y., Matsuzawa, D., Ishii, D., Fuchida, T., Goto, T., Sutoh, C., & Shimizu, E. (2019). Paternal methyl donor deficient diets during development affect male offspring behavior and memory-related gene expression in mice. *Developmental Psychobiology*.  
<https://doi.org/10.1002/dev.21801>
- Samanta, S., Rajasingh, S., Cao, T., Dawn, B., & Rajasingh, J. (2017). Epigenetic dysfunctional diseases and therapy for infection and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.030>
- Samochowicz, A., Mordasewicz, A., Arentowicz, G., & Samochowicz, J. (2005). *Psychiatria*. *Psychiatria*, 2(1), 9–18. Retrieved from  
<https://journals.viamedica.pl/psychiatria/article/view/29226/23984>
- Schwarz, J. M., Hutchinson, M. R., & Bilbo, S. D. (2011). Early-Life Experience Decreases Drug-Induced Reinstatement of Morphine CPP in Adulthood via Microglial-Specific Epigenetic

- Programming of Anti-Inflammatory IL-10 Expression. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3297-11.2011>
- Segovia, S. A., Vickers, M. H., Gray, C., & Reynolds, C. M. (2014). Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *BioMed Research International*.  
<https://doi.org/10.1155/2014/418975>
- Seminotti, B., Zanatta, Â., Ribeiro, R. T., da Rosa, M. S., Wyse, A. T. S., Leipnitz, G., & Wajner, M. (2018). Disruption of Brain Redox Homeostasis, Microglia Activation and Neuronal Damage Induced by Intracerebroventricular Administration of S-Adenosylmethionine to Developing Rats. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1275-6>
- Shaftel, S. S., Griffin, W. S. T., & Kerry, K. M. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: An evolving perspective. *Journal of Neuroinflammation*.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-7>
- Sharma, S., Hryhorczuk, C., & Fulton, S. (2012). Progressive-ratio Responding for Palatable High-fat and High-sugar Food in Mice. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/3754>
- Shen, J., Liu, Y., Ren, X., Gao, K., Li, Y., Li, S., ... Yang, X. (2016). Changes in DNA Methylation and Chromatin Structure of Pro-inflammatory Cytokines Stimulated by LPS in Broiler Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Poultry Science*, *95*(7), 1636–1645.  
<https://doi.org/10.3382/ps/pew086>
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*.  
<https://doi.org/10.1172/JCI28898>
- Shi, X.-Y., Ding, W., Li, T.-Q., Zhang, Y.-X., & Zhao, S.-C. (2017). Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines via the Akt/FOXO3a Signaling Pathway. *Medical Science Monitor*, *23*, 5793–5802.  
<https://doi.org/10.12659/MSM.904597>
- Skinner, M. K., Manikkam, M., & Guerrero-Bosagna, C. (2011). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reproductive Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.012>
- Smith, D. V., Rigney, A. E., & Delgado, M. R. (2016). Distinct Reward Properties are Encoded via Corticostriatal Interactions. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep20093>
- Soda, K. (2018). Polyamine Metabolism and Gene Methylation in Conjunction with One-Carbon Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 3106.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19103106>

- Suh, H.-S., Choi, S., Khattar, P., Choi, N., & Lee, S. C. (2010). Histone deacetylase inhibitors suppress the expression of inflammatory and innate immune response genes in human microglia and astrocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9192-0>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(September), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Tabachnik, T., Kisliouk, T., Marco, A., Meiri, N., & Weller, A. (2017). Thyroid Hormone-Dependent Epigenetic Regulation of Melanocortin 4 Receptor Levels in Female Offspring of Obese Rats, 158(November 2016), 842–851. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1854>
- Tremolizzo, L., Carboni, G., Ruzicka, W. B., Mitchell, C. P., Sugaya, I., Tueting, P., ... Guidotti, A. (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.262658999>
- Ulloque, R. A., & Ulloque, R. A. (1999). Sistema cerebral del placer y de la drogodependencia. *Biomédica*. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v19i4.1037>
- Urduingui, R. G., Sanchez-Mut, J. V., & Esteller, M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70262-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70262-5)
- Vaiserman, A. M., & Koliada, A. K. (2017). Early-life adversity and long-term neurobehavioral outcomes: Epigenome as a bridge? *Human Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0129-z>
- Vanhees, K., Vonhögen, I. G. C., Van Schooten, F. J., & Godschalk, R. W. L. (2014). You are what you eat, and so are your children: The impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1427-9>
- Veskovic, M., Mladenovic, D., Milenkovic, M., Tosic, J., Borozan, S., Gopcevic, K., ... Radosavljevic, T. (2019). Betaine modulates oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and Akt/mTOR signaling in methionine-choline deficiency-induced fatty liver disease. *European Journal of Pharmacology*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.043>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Tomasi, D., & Baler, R. D. (2013). Obesity and addiction: Neurobiological overlaps. *Obesity Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01031.x>
- Volkow, N. D., & Wise, R. A. (2005). How can drug addiction help us understand obesity? *Nature*

- Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1452>
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>
- Walker, D. M., & Nestler, E. J. (2018). Neuroepigenetics and addiction. In *Handbook of Clinical Neurology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00048-X>
- Wang, H., Zhou, J., Liu, Q. Z., Wang, L. L., & Shang, J. (2017). Simvastatin and Bezafibrate ameliorate Emotional disorder Induced by High fat diet in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02576-5>
- Wang, L., de Zoeten, E. F., Greene, M. I., & Hancock, W. W. (2009). Immunomodulatory effects of deacetylase inhibitors: therapeutic targeting of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd3031>
- Wang, P., Zhang, Y., Gong, Y., Yang, R., Chen, Z., Hu, W., ... Huang, C. (2018). Sodium butyrate triggers a functional elongation of microglial process via Akt-small RhoGTPase activation and HDACs inhibition. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.006>
- Wang, X., Cao, Q., Yu, L., Shi, H., Xue, B., & Shi, H. (2016). Epigenetic regulation of macrophage polarization and inflammation by DNA methylation in obesity. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87748>
- Wang, Y., Surzenko, N., Friday, W. B., & Zeisel, S. H. (2016). Maternal dietary intake of choline in mice regulates development of the cerebral cortex in the offspring. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.15-282426>
- Warnault, V., Darcq, E., Levine, A., Barak, S., & Ron, D. (2013). Chromatin remodeling-a novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.4>
- Waterland, R. A. (2006). Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *The Journal of Nutrition*. <https://doi.org/0022-3166/06>
- WHO. (2017). WHO | Obesity and overweight. *Who*.
- Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M., & Wyatt, S. B. (2015). Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current Obesity Reports*. <https://doi.org/10.1007/s13679-015-0169-4>
- Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P. M., & Charron, M. J. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.006>

- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wright, K. N., Hollis, F., Duclot, F., Dossat, A. M., Strong, C. E., Francis, T. C., ... Kabbaj, M. (2015). Methyl Supplementation Attenuates Cocaine-Seeking Behaviors and Cocaine-Induced c-Fos Activation in a DNA Methylation-Dependent Manner. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5227-14.2015>
- Wu, Y., Lousberg, E. L., Moldenhauer, L. M., Hayball, J. D., Coller, J. K., Rice, K. C., ... Hutchinson, M. R. (2012). Inhibiting the TLR4-MyD88 signalling cascade by genetic or pharmacological strategies reduces acute alcohol-induced sedation and motor impairment in mice. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01572.x>
- Xu, X., Ji, H., Liu, G., Wang, Q., Liu, H., Shen, W., ... Duan, S. (2016). A significant association between BDNF promoter methylation and the risk of drug addiction. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.010>
- Yager, L. M., Garcia, A. F., Wunsch, A. M., & Ferguson, S. M. (2015). The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.033>
- Yang, X., Wang, X., Liu, D., Yu, L., Xue, B., & Shi, H. (2014). Epigenetic Regulation of Macrophage Polarization by DNA Methyltransferase 3b. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1293>
- Yanguas-Casás, N., Crespo-Castrillo, A., de Ceballos, M. L., Chowen, J. A., Azcoitia, I., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2018). Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23263>
- Zeltser, L. M. (2018). Feeding circuit development and early-life influences on future feeding behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.23>
- Zhang, B., Denomme, M. M., White, C. R., Leung, K. Y., Lee, M. B., Greene, N. D. E., ... Baltz, J. M. (2015). Both the folate cycle and betaine-homocysteine methyltransferase contribute methyl groups for DNA methylation in mouse blastocysts. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.14-261131>
- Zhang, N. (2018). Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>
- Zhang, X., Cui, Y., Jing, J., Cui, Y., Xin, W., & Liu, X. (2011). Involvement of p38/NF-κB signaling pathway in the nucleus accumbens in the rewarding effects of morphine in rats. *Behavioural*

*Brain Research*, 218(1), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.049>

Zou, J. Y., & Crews, F. T. (2014). Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087915>