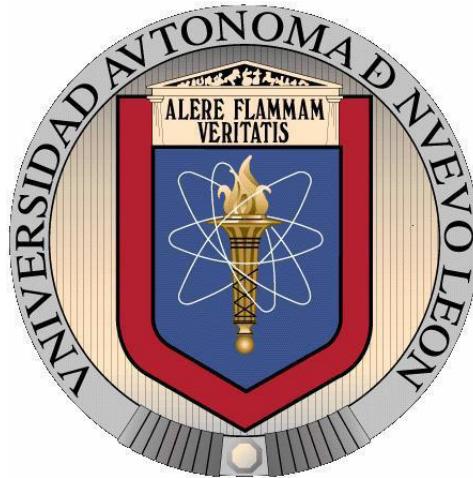


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL NÚCLEO
ACCUMBENS EN LA DESCENDENCIA DE RATAS WISTAR CON ADICCIÓN A
LA COMIDA HIPERCALÓRICA**

PRESENTA

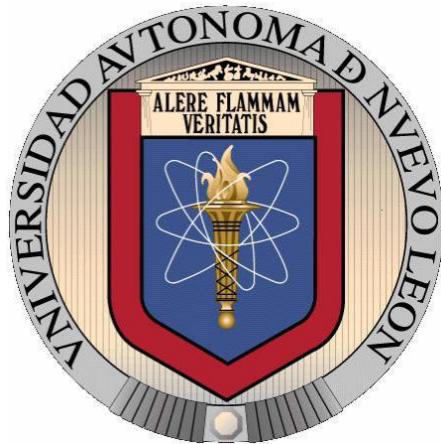
LARISA JAJAIRA MONTALVO MARTÍNEZ

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

JUNIO, 2017

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

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR



TESIS

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL NÚCLEO
ACCUMBENS EN LA DESCENDENCIA DE RATAS WISTAR CON ADICCIÓN A
LA COMIDA HIPERCALÓRICA**

PRESENTA

LARISA JAJAIRA MONTALVO MARTÍNEZ

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

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JUNIO, 2017

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL NÚCLEO
ACCUMBENS EN LA DESCENDENCIA DE RATAS WISTAR CON ADICCIÓN A
LA COMIDA HIPERCALÓRICA**

Aprobación de Tesis:

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ

Co-Directora de Tesis

DRA. C. HERMINIA GPE. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Miembro de la Comisión de Tesis

DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
FINANCIAMIENTO.....	viii
ÁREA DE TRABAJO.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. ANTECEDENTES	
3.1 La obesidad, un problema de salud mundial.....	4
3.2 Etiología de la obesidad.....	5
3.2.1 La obesidad es un problema de comportamiento aberrante hacia la ingesta de alimentos hipercalóricos.....	5
3.3 Adicción.....	6
3.3.1 La activación del circuito de la recompensa genera adicción.....	6
3.3.2 Etiología de las adicciones.....	7
a) Modulación de la neurotransmisión por el consumo de drogas.....	7
b) Efectos moleculares del consumo de drogas.....	9
3.4 Correlaciones moleculares entre la adicción a las drogas y el consumo de comida. ¿Adicción a la comida?.....	11
3.5 Herencia transgeneracional de un fenotipo.....	12
3.5.1 Mecanismos moleculares de la transmisión del fenotipo adictivo a la descendencia.....	15
a) Mecanismos epigenéticos y su importancia en la transmisión del fenotipo adictivo.....	15
3.6 Reprogramación metabólica por nutrientes y transmisión del comportamiento compulsivo hacia su ingesta a la descendencia	16
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19

VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
<i>i.</i> Estrategia Experimental.....	20
<i>ii.</i> Metodología	
a) Condicionamiento operante.....	23
b) Obtención y almacenamiento de muestras.....	25
c) Microarreglos de expresión.....	26
d) Caracterización del perfil de expresión génica del núcleo accumbens en la descendencia de ratas Wistar con/sin exposición a dieta hipercalórica y firma genómica de genes candidatos implicados en la adicción a la comida	36
e) Integración de datos de microarreglos y comportamiento operante.....	37
f) Análisis estadístico.....	37
VII. RESULTADOS	
<i>i.</i> Condicionamiento operante hacia la comida hipercalórica.....	38
a) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos y hembras (F0), expuestas a dieta control.....	38
b) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de la descendencia (F1) de machos expuestos a dieta control.....	41
c) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de madres hembras F0, expuestas o no a dieta de cafetería.....	45
d) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos F1, descendientes de hembras F0, expuestas a dieta control.....	46
e) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos F1, descendientes de hembras F0, expuestas a dieta de cafetería.....	48
<i>ii.</i> Caracterización del perfil de expresión génica del núcleo accumbens en la descendencia de madres con/sin exposición a dieta hipercalórica.....	51
a) Análisis de expresión génica diferencial entre los grupos.....	52
b) Comparación del perfil de expresión de la firma de genes relacionados con adicción a drogas, con la expresión génica en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.....	53
c) Evaluación del factor comportamiento en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens en la descendencia (F1) de madres con/sin dieta hipercalórica.....	54
d) Evaluación del factor dieta materna en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens de su descendencia (F1).....	55
e) Evaluación del factor comportamiento materno en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens de la descendencia (F1) provenientes de madres con/sin dieta hipercalórica.....	56
f) Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en la descendencia (F1) de madres con exposición previa o no a una dieta hipercalórica	57

iii. Firma de genes candidatos implicados en el comportamiento de adicción a la comida.....	59
VIII. DISCUSIÓN.....	61
IX. CONCLUSIÓN.....	64
X. PERSPECTIVAS.....	65
XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	66
XII. REFERENCIAS.....	67
XIII. ANEXOS.....	74

AGRADECIMIENTOS

Quiero Agradecer a:

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

Dra. C. Rocío Ortiz López por su valiosa colaboración y apoyo para la realización de este proyecto.

Dra. C. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez por su compromiso y supervisión en el desarrollo de este proyecto.

M.C. Robbi E. Cárdenas Pérez por su contribución en la realización de este trabajo.

Dra. C. Sandra Santuario por sus recomendaciones y sugerencias para realizar este trabajo de la mejor manera.

Dr. C. Víctor M. Treviño Alvarado por su apreciable apoyo en el análisis estadístico de los microarreglos.

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

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

A mis amigos y colegas: Maricela Medrano, Edelin Posada, Bianka Camacho y Gabriel López por su apoyo a lo largo de estos 2 años de Maestría.

Al MC. Daniel Morales Rodríguez, por sus valiosas enseñanzas y sus palabras llenas de aliento, que sin duda me dieron la fortaleza y sabiduría para ver la vida de otra manera y ser ante todo agradecidos con Dios.

DEDICATORIA

Principalmente, a Dios, por permitirme llegar hasta el día de hoy; darme la fortaleza y la sabiduría para llevar a cabo con éxito este trabajo. Además de regalarme cada día la capacidad de adquirir nuevo conocimiento y experiencia que, con anhelo espero sirva de ayuda a la humanidad.

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

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

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

Da lo mejor de ti y lo mejor vendrá...

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fué apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con apoyo de la convocatoria Sectorial Salud (255317) y Ciencia Básica (261420), y por la Sociedad Internacional de Neuroquímica (CAEN) 2016 para el Dr. Alberto Camacho.

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 Neurociencias del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL bajo la dirección del Dr. Alberto Camacho Morales.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Circuito de la recompensa del cerebro (Humanos).....	7
Figura 2. Circuito neuroquímico de la recompensa.....	8
Figura 3. Mecanismos transcripcionales y epigenéticos de la adicción.....	11
Figura 4. Reprogramación fetal y modelos de herencia transgeneracional.....	14
Figura 5. Descripción gráfica de los componentes de la caja de comportamiento operante (caja de Skinner)	22
Figura 6. Esquema de protocolo completo para el entrenamiento de condicionamiento operante en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.....	24
Figura 7. Árbol genealógico de la obtención de los grupos experimentales, con base en el tiempo de exposición al estímulo recompensante y el comportamiento observado en la caja de condicionamiento operante.....	24
Figura 8. Ilustración del corte y coordenadas de localización para la región del núcleo accumbens shell en el cerebro de roedores, tomadas del atlas de Paxinos y Watson.....	25
Figura 9. Ilustración de la conformación del chip de expresión: GENECHIP® RAT TRANSCRIPTOME PICO ASSAY 1, Affymetrix.....	35
Figura 10. Comportamiento operante hacia la comida hipercalórica entre machos y hembras (F0).....	39
Figura 11. Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (madres) adictas y no adictas, expuestas a dieta control.....	39
Figura 12. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F0 (padres) adictos y no adictos, expuestas a dieta control.....	40
Figura 13. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales de los tres días del protocolo FR1	41
Figura 14. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales de los cuatro días del protocolo FR5	42
Figura 15. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR	42

Figura 16. Gráfica de puntos del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales durante los cinco días del protocolo PR	43
Figura 17. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de padres adictos, expuestos a dieta control.....	44
Figura 18. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de padres no adictos, expuestos a dieta control.....	44
Figura 19. Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (adictas y no adictas), expuestas a dieta de cafetería.....	45
Figura 20. Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (adictas y no adictas), expuestas a dieta control.....	45
Figura 21. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta control; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR	46
Figura 22. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres adictas, expuestas a dieta control.....	47
Figura 23. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres no adictas, expuestas a dieta control	47
Figura 24. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta cafetería; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR	48
Figura 25. Comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta cafetería; número de eventos totales durante los cinco días del protocolo PR.....	49
Figura 26. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres adictas, expuestas a dieta de cafetería.....	49
Figura 27. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres no adictas, expuestas a dieta de cafetería.....	50
Figura 28. Métricas de control y normalización de los microarreglos.....	51
Figura 29. Evaluación de los factores: comportamiento, dieta y programación fetal materna, sobre la expresión génica de la descendencia (F1)	52
Figura 30. Genes diferencialmente expresados en el núcleo accumbens de machos (F1) adictos y no adictos, tomando en cuenta el factor comportamiento.....	54
Figura 31. Genes diferencialmente expresados en el núcleo accumbens de machos (F1) adictos provenientes de madres con/sin exposición previa a dieta hipercalórica.....	55
Figura 32. Genes diferencialmente expresados en el núcleo accumbens de machos (F1) provenientes de madres adictas y no adictas.....	56

Figura 33. Principales vías de señalización de los genes diferencialmente expresados en los machos descendientes (F1) de madres con/ sin exposición previa a dieta hipercalórica.....	57
Figura 34. Clase de proteínas a la que pertenecen los genes diferencialmente expresados en los machos descendientes (F1) de madres con/ sin exposición previa a dieta hipercalórica.....	58
Figura 35. Firma de genes propuesto para comprender el comportamiento adictivo hacia la comida hipercalórica.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Material biológico y no biológico.....	20
Tabla 2. Reactivos.....	20
Tabla 3. Equipo de laboratorio.....	21
Tabla 4. Diluciones seriadas de los stocks de Poly-A RNA.....	26
Tabla 5. Componentes para 1 reacción de control de RNA total/Poly-A RNA.....	27
Tabla 6. Componentes 1 reacción de síntesis de la 1ra cadena de cDNA.....	27
Tabla 7. Componentes para 1 reacción de síntesis de la 2da cadena de cDNA.....	28
Tabla 8. Componentes para 1 reacción de IVT.....	28
Tabla 9. Componentes 1 reacción del 2do ciclo de la ss-cDNA.....	30
Tabla 10. Componentes para 1 reacción de fragmentación.....	32
Tabla 11. Componentes para 1 reacción de marcaje.....	33
Tabla 12. Componentes para 1 reacción de hibridación.....	34
Tabla 13. Cocktail de hibridación para 1 muestra.....	34
Tabla 14. Genes alterados en diferentes áreas del cerebro relacionadas con adicción a drogas.....	53
Tabla 15. Perfil de expresión en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.....	53
Tabla 16. Función e implicaciones de los genes de la firma génica propuesta en adicción a la comida hipercalórica.....	60

ABREVIATURAS

F0	Primera generación (padres)
F1	Segunda generación (hijos)
NAc	Núcleo accumbens
nM	Nanomolar
Mm	Milimolar
ng	Nanogramo
μg	Microgramo
mg	Miligramo
°C	Grados centígrados
DEPC	Dietil pirocarbonato
TBE	Buffer Tris, Borato, EDTA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PR	Progresivo
RIN	Número de Integridad del RNA
cDNA	DNA complementario
cRNA	RNA complementario
nm	Nanómetros
ss-cDNA	DNA complementario de cadena simple
UDG	Uracil-DNA glicosilasa
APE 1	Endonucleasa apurínica / apirimidinica 1
TdT	Desoxinucleotidil transferasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
CB1	Receptor canabinoide de tipo 1
BNDF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
GABA	Ácido gamma-amino butírico
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina proteína kinasa II
GluA1 y A2	Subunidad A1 y A2 del receptor de glutamato.
HDACs	Histona desacetilasas
HMT	Histona metil trasnferasas

RESUMEN

El desarrollo de obesidad se caracteriza por el incremento en el consumo de alimentos hipercalóricos. Existen correlativos tanto conductuales como moleculares, entre el comportamiento adictivo hacia la comida hipercalórica y la adicción a drogas. Durante la adicción a las drogas se producen cambios en la expresión de genes selectivos implicados en la plasticidad neuronal. En el presente estudio, se generó un modelo animal de adicción a la comida hipercalórica y se determinó: 1) si la conducta adictiva es transmitida a la descendencia y 2) las alteraciones en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens (NAc) en la descendencia. Se emplearon 9 grupos de ratas Wistar, incluyendo un grupo de hembras madre (F0) alimentadas por 9 semanas (incluyendo el embarazo y la lactancia) con dieta de cafetería (DC), que fueron sometidas a los protocolos de condicionamiento operante (FR1, FR5, PR) en la caja tipo Skinner, durante 12 días para obtener pellets de chocolate como recompensa. El análisis de la expresión global de genes se determinó empleando la tecnología de microarreglos. Los resultados demuestran que el comportamiento semejante a la adicción de los machos y hembras padres (F0) se transmite a sus descendientes (F1). La transmisión del comportamiento operante es mayor en el grupo de descendientes de madres sometidas a programación nutricional. Asimismo, identificamos mediante microarreglos de expresión que los sujetos con comportamiento adictivo exhiben una firma genómica que involucra a 8 genes presentes en los procesos de exocitosis de neurotransmisores (Syt17, Stx1a), señalización sináptica (Chrm3, Gpr149); remodelación del citoesqueleto y plasticidad sináptica (Sema3e, Abi3bp), y en los procesos de alteración en el consumo de alcohol tanto en humanos como en modelos animales (Hbb-b1, Polr3k, Mir30a). Nuestros resultados demuestran que el comportamiento operante hacia la búsqueda de una recompensa en los padres puede transmitirse a la descendencia con cambios selectivos en la expresión génica.

ABSTRACT

The development of obesity is characterized by the increase in the consumption of hypercaloric foods. There are correlates both behavioral and molecular between addictive behavior towards hypercaloric food and drug addiction. During drug addiction changes occur in the expression of the selective genes involved in neuronal plasticity. In the present study, an animal model of hypercaloric food addiction was generated and it was determined: 1) if the addictive behavior is transmitted to the offspring and 2) the alterations in gene expression profile of the accumbens nucleus (NAc) in the (F0) who were submitted to the operational conditioning protocols (FR1, FR5), PR in the Skinner box for 12 days (including pregnancy and lactation) to get chocolate pellets as a reward. Analysis of global gene expression was determined using microarray technology. The results show that behavior observed in both males and females addict parents (F0) are transmitted to their offspring (F1). Transmission of operant behavior is greater in the offspring from mothers undergoing nutritional programming. In addition, we have identified by global expression microarrays that subjects with addictive behavior exhibit a genomic signature involving 8 genes present in the neurotransmitters exocytosis processes (Syt17, Stx1a), synaptic signaling (Chrm3, Gpr149); cytoskeleton remodeling and synaptic plasticity (Sema3e, Abi3bp), also in processes of excessive consumption of alcohol in both men and animal models (Hbb-b1, Polr3k, Mir30a). Our results demonstrate that the operant behavior towards the search for a reward in the parents can be transmitted to the offspring with selective changes in gene expression.

I. INTRODUCCIÓN

La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa, superior a los $30\text{kg}/\text{m}^2$ de Índice de masa corporal (IMC), lo cual se considera un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, entre otras (OMS, 2016). 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. Se propone que en este escenario existe un desequilibrio calórico, en donde el número de calorías consumidas excede la cantidad de calorías gastadas (Ludwig, et al., 2001). 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; DiLeone, et al., 2012). Tanto la conducta compulsiva para la búsqueda de comida hipercalórica como el de las drogas se registran en un circuito cerebral conocido como el circuito de la recompensa. Este circuito se compone principalmente de regiones cerebrales que incluyen el área ventral tegmental (AVT), la amígdala, la corteza prefrontal (CPF) y el núcleo accumbens (NAc) (Koob y Volkow, 2010).

El establecimiento de la adicción se asocia a un proceso de neuroplasticidad en las regiones del circuito de la recompensa, que implica cambios inducidos por el uso crónico del estímulo recompensante, generalmente drogas (Ersche, et al., 2012). Actualmente, diversas investigaciones han aportado evidencia científica que definen a la región del núcleo accumbens como una región clave implicada en los procesos preferenciales-adictivos hacia la comida apetecible e hipercalórica que conducen a la obesidad (Volkow, et al., 2011; DiLeone, et al., 2012). En este respecto, se ha observado que la exposición a comida hipercalórica genera alteraciones en la expresión de genes como: la tirosina hidroxilasa, los receptores de dopamina D1 y D2, el receptor μ -opioide, el receptor CB1 y el factor de transcripción BDNF, en el núcleo accumbens, lo cual se refleja en alteraciones en el comportamiento hacia la ingesta de comida hipercalórica (Ong et al., 2013; Martire et al., 2014). Dichos cambios en la expresión génica, se han observado también en la descendencia de modelos animales con exposición a dietas hipercalórica durante el embarazo y la lactancia, lo cual genera alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso y la susceptibilidad a cambios en el comportamiento, incluyendo la adicción (Alsio et al., 2010; Naef et al., 2011; Luzzo et al., 2012).

Lo anterior sugiere que la obtención de los efectos placenteros de la comida es una poderosa fuerza motivante que puede anular las señales de saciedad homeostáticas, y de acuerdo con esto, puede contribuir a que se generen alteraciones en la expresión génica a nivel de sistema de recompensa. Alteraciones en este sistema se manifiestan en cambios positivos hacia la búsqueda de comida con sabor agradable y alto contenido calórico, promoviendo así un comportamiento adictivo y posterior desarrollo de obesidad. Es interesante que, las alteraciones en el comportamiento en padres adictos a la comida hipercalórica pueden ser transmitidas a la descendencia.

En esta tesis identificamos los cambios en el nivel de expresión global, de genes implicados en la ingesta descontrolada de comida en un modelo murino y su probable transmisión a la descendencia.

II. JUSTIFICACIÓN

México es el segundo país a nivel mundial con mayor prevalencia de obesidad, la cual incrementa el desarrollo de patologías metabólicas que encabezan las principales causas de mortalidad en la población.

Actualmente, se propone que la ingesta descontrolada de alimentos hipercalóricos puede ser una de las causas implicadas en el desarrollo de obesidad. Sin embargo, existe una falta de evidencias científicas que definan a la comida como un elemento adictivo, así como de los genes implicados en su establecimiento y potencial transmisión a la descendencia.

Por lo tanto, el uso de un modelo animal de adicción a la comida y la tecnología de microarreglos de expresión global, contribuirá en la identificación de genes implicados en la ingesta descontrolada de comida, su impacto en el desarrollo de obesidad y su probable transmisión a la descendencia.

III. ANTECEDENTES

3.1. La obesidad, un problema de salud mundial.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad puede ser definida como la acumulación anormal o excesiva de grasa que incrementa el índice de masa corporal (IMC). El IMC se obtiene dividiendo el peso en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2). Un IMC por arriba de los $30\text{kg}/\text{m}^2$ clasifica a una persona con estado de obesidad, mientras que un IMC menor a 30, pero mayor a los $25\text{ kg}/\text{m}^2$, se considera con sobrepeso. La obesidad, es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como: diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (OMS, 2016). Dichas patologías, representan la principal causa de mortalidad en el mundo, así como a nivel nacional (IMCO, 2015; OMS, 2016). Se estima que cada año fallecen alrededor 3.4 millones de personas adultas a consecuencia de patologías relacionadas con este padecimiento.

A partir de 1980, la obesidad se ha multiplicado, llegando a representar una epidemia a nivel mundial. Hasta el año 2014, se estimó que había más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años con sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos (OMS, 2016). Estas cifras, se estiman podrían llegar a duplicarse para el año 2030.

En México, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en adultos mayores de 20 años es del 71.3% que corresponde a 48.6 millones de personas. De este 71.3%, el 32.4% corresponde a la prevalencia de obesidad y el 38.8% restante al sobrepeso. Estos porcentajes clasificaron a México, hasta el año 2014, como el segundo lugar a nivel mundial con mayor prevalencia de obesidad (Barquera. et al., 2013; Scully, 2014; OMS, 2016). Por su parte, en niños de 5 a 11 años, se estima una prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad del 44.1%, ubicando a México como el cuarto país a nivel mundial con mayor prevalencia en obesidad infantil (Franco, 2012; Davila-Torres, 2015). Por su parte, de acuerdo a las estadísticas, la obesidad es más frecuente en el género femenino con respecto el masculino, en infantes y adultos (Wojcicki et al., 2012; Franco, 2012).

3.2. Etiología de la obesidad.

La obesidad es una enfermedad que ha sido vista sólo como un problema metabólico-periférico del cuerpo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el Sistema Nervioso Central (SNC), juega un papel importante en la regulación del metabolismo que involucra la ingesta de comida y del comportamiento positivo para su selección de tipo adictivo.

3.2.1 La obesidad puede ser un problema de comportamiento aberrante hacia la ingesta de alimentos hipercalóricos.

Actualmente, se sabe que la obesidad tiene un origen multifactorial en el que se involucran la susceptibilidad genética, los estilos de vida y las características del entorno, con influencia de diversos determinantes subyacentes, como la globalización, la cultura, la condición económica, la educación, la urbanización y el entorno político y social (Cecchini et al., 2010; Scully, 2014). Sin embargo, se ha evidenciado que 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. Esto promueve la existencia de un desequilibrio calórico, en donde el número de calorías consumidas excede la cantidad de calorías gastadas (Ludwig, et al., 2001). Se ha propuesto que dicho desequilibrio calórico se relaciona con un posible comportamiento adictivo hacia la comida hipercalórica (rica en grasa o en azúcar) debido al alto valor recompensante que posee, llegando a evadir el sistema de regulación energética corporal (Volkow y Wise, 2005; Volkow, et al., 2011; Volkow, et al., 2012; Kenny, 2011).

Datos experimentales que apoyan el modelo de adicción a la comida, han propuesto que, tanto en modelos animales como en humanos, la exposición repetida a comida con alto contenido de grasa y /o azúcar, deteriora la inhibición de la ingesta de comida a nivel neuronal (Avena, et al., 2008), promoviendo incapacidad de los individuos con obesidad para controlar la ingesta de comida hipercalórica (Kenny, 2011; DiLeone, et al., 2012). Por otra parte, diversas investigaciones han encontrado 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); existe un uso continuo del estímulo a pesar de las consecuencias negativas que implica su ingesta. Los individuos

muestran un incremento en el tiempo invertido en el consumo y la búsqueda del estímulo con respecto a otras actividades; permanece un deseo intenso por obtener la recompensa (estímulo satisfactorio generado por la droga o la comida hipercalórica) (Volkow y Wise, 2005; Volkow, et al., 2011; Volkow, et al., 2012; Kenny, 2011). Debido a 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 el fenómeno de adicción y su relación con la ingesta de comida.

3.3. Adicción.

La adicción, se define como una enfermedad crónica y recurrente del cerebro que se caracteriza por la búsqueda y el consumo compulsivo de un estímulo recompensante, a pesar de sus consecuencias nocivas. Dicha enfermedad es consecuencia de cambios morfológicos (nueroplásticidad) a nivel cerebral, específicamente en regiones que pertenecen al circuito de la recompensa, lo cual promueve el incremento de un comportamiento compulsivo y pérdida de control sobre el consumo del estímulo recompensante (Volkow y Wise, 2005).

3.3.1 La activación del Circuito de la recompensa genera adicción.

El circuito de la recompensa, está compuesto por centros en el sistema nervioso central que obedecen a estímulos específicos y naturales, regulados por neurotransmisores y que permiten que el individuo desarrolle conductas aprendidas que responden a hechos placenteros o de desagrado. Las regiones cerebrales que lo conforma son principalmente las que integran las vías de neurotransmisión dopaminérgica que incluyen: el área ventral tegmental (AVT), la amígdala, la corteza prefrontal (CPF) y el núcleo accumbens (NAc) (Figura 1). Sin embargo, también existen otras regiones implicadas en el desarrollo de las adicciones e importantes para el circuito de la recompensa. Por ejemplo, el hipocampo (Hipp), el tálamo (Thal), el locus coeruleus (LC), la corteza orbitofrontal (OFC), el rafe dorsal serotoninérgico (DR), el hipotálamo lateral (LH), el estriado, la sustancia nigra pars compacta (SNr), entre otras, Figura 1(Koob y Volkow, 2010; Russo y Nestler, 2013). En conjunto, estas regiones pueden desencadenar una serie de comportamientos alterados que incluyen la predicción de la recompensa (Schultz, 2007), la hedonía (Wise, 1978, 1982), el reforzamiento (Wise y Koob,

2014), la motivación, el aprendizaje (Wise, 2004) y la prominencia de incentivos (Berridge, 2007), aspectos característicos de un comportamiento adictivo.

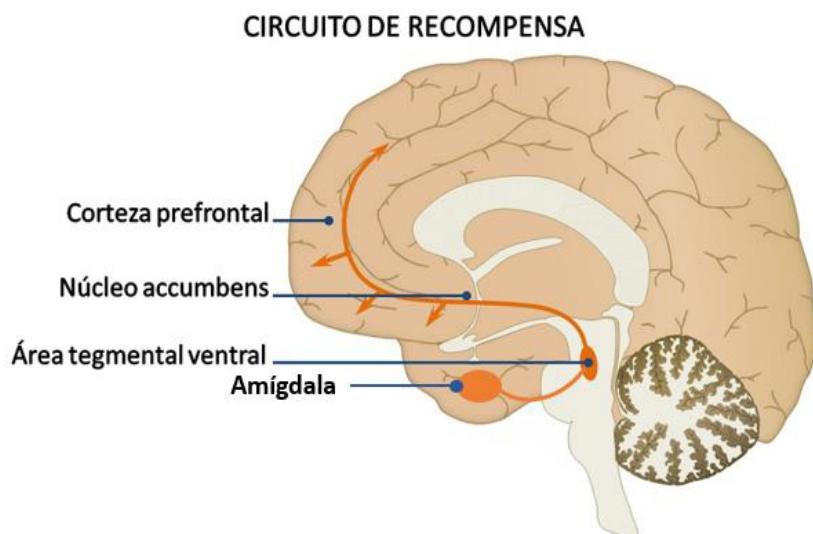


Figura 1. Circuito de la recompensa del cerebro (Humanos). Ilustración de las principales regiones que conforman el circuito: corteza prefrontal, núcleo accumbens, área ventral tegmental y amígdala.

3.3.2 Etiología de las adicciones.

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.

a) Modulación de la neurotransmisión por el consumo de drogas.

En este sentido, se conoce que los psicoestimulantes (drogas), actúan en las terminales axonales de las neuronas, donde se liberan diversos neurotransmisores como la dopamina, glutamato, serotonina, entre otros. Su acción principal, es incrementar la concentración de dichos neuromoduladores, mediante el bloqueo de la recaptación de los mismos en las terminales sinápticas (Berke y Hyman, 2000). Todas las drogas, tienen un mecanismo principal de acción en común, que es incrementar la transmisión dopaminérgica, específicamente a través de la inervación ascendente del área ventral tegmental hacia el núcleo accumbens, así como hacia otras regiones límbicas relacionadas con el circuito de la recompensa (amígdala, corteza prefrontal, hipocampo, estriado dorsal, etc.). Adicionalmente, cada una de estas regiones puede

modularse por diversos tipos de neurotransmisión que incluyen neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas, de tipo opioide, canabinoide, nicotínico y de GABA_A, a nivel de la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo y la activación de los receptores correspondientes, Figura 2 (Koob y Volkow, 2010; Russo, Nestler, 2013).

Finalmente, cabe destacar que independientemente del mecanismo de acción y la región que activen las drogas, todas son capaces de inducir neuroadaptaciones moleculares en común, las cuales median la naturaleza del fenotipo adictivo.

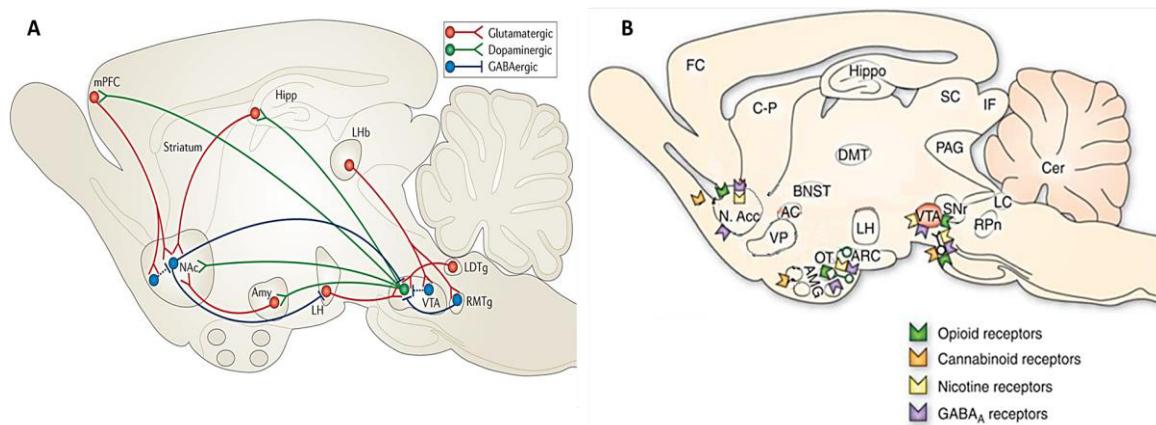


Figura 2. Circuito neuroquímico de la recompensa. A) Tipos y proyecciones neuronales entre regiones del circuito de la recompensa implicados en la adicción a drogas. Líneas rojas: proyecciones glutamatérgicas; Líneas verdes: proyecciones dopaminérgicas; Líneas azules: proyecciones GABAérgicas. B) Tipo de receptores activados en las diversas regiones del circuito de la recompensa en diversos tipos de adicciones. Los opioides activan los receptores opioides en el AVT, el NAc y la amígdala mediante acciones directas o indirectas vía interneuronas. Los opioides facilitan la liberación de dopamina en el núcleo accumbens por una acción ya sea en el AVT o el núcleo accumbens, pero también se supone que activan elementos independientes del sistema de dopamina. El alcohol activa los receptores de ácido γ -amino butírico-A (GABA_A) o la liberación de GABA en el AVT, el núcleo accumbens y la amígdala por acciones directas en el receptor GABA_A o por liberación indirecta de GABA. La nicotina activa los receptores nicotínicos de acetilcolina en el AVT, el núcleo accumbens y la amígdala, ya sea directa o indirectamente, a través de acciones en interneuronas. Los cannabinoides activan los receptores cannabinoides CB1 en el AVT, el núcleo accumbens y la amígdala. Los cannabinoides facilitan la liberación de dopamina en el núcleo accumbens a través de un mecanismo desconocido. AC, comisura anterior; AMG, amígdala; ARC, núcleo arqueado; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; Cer, cerebro; C - P, caudado - putamen; DMT, tálamo dorsomedial; FC, corteza frontal; Hippo, hipocampo; IF, colículo inferior; LC, locus coeruleus; LH, hipotálamo lateral; NAcc y NAc., Nucleus accumbens; OT, tracto olfatorio; PAG, gris periaqueductal; RPn, núcleo pontino reticular; SC, colliculus superior; SNr, substantia nigra pars reticulata; VP, pallidum ventral; AVT, Área ventral tegmental.

*Imágenes tomadas y modificadas de Koob & Volkow, 2010; Russo, Nestler, 2013.

b) Efectos moleculares del consumo de drogas.

Diversas investigaciones han revelado que las neuroadaptaciones que se generan durante el proceso adictivo en las diversas regiones del circuito de la recompensa, están moduladas por procesos transcripcionales y epigenéticos. De éstos depende la transición del consumo ocasional de drogas hacia el establecimiento del comportamiento adictivo (Nestler, 2014).

La modulación transcripcional por la exposición crónica de drogas involucra varios procesos como: la activación de factores de transcripción, la modificación o remodelación de la cromatina, RNAs no codificantes, entre otros (Nestler, 2001). Procesos que, con el avance en las tecnologías de análisis genómico global, se han podido identificar o validar su participación en la modulación transcripcional de la adicción dependiente de drogas, su impacto en la morfología neuronal, la alteración de señalización sináptica y su relación con el comportamiento adictivo (Nestler, 2014).

De los primeros genes que se vieron alterados en cuanto a su expresión fueron los factores de transcripción. Entre los cuales se encuentra, el factor de transcripción ΔFOSB. Este factor pertenece a la familia de factores de transcripción FOS, el cual forma heterodímeros con factores de la familia JUN para crear una proteína activa (AP1), la cual regula la expresión génica, en condiciones normales. Es de gran interés que, la exposición aguda y crónica a drogas, promueve la sobreexpresión de ΔFOSB, principalmente en la región del NAc y la CPF (Nestler, 2008; Perrotti, et al., 2008), provocando el incremento en la actividad locomotora (Kelz, et al., 1999), la preferencia (Zachariou, et al., 2006) y la autoadministración de diversas drogas (Colby, et al., 2003) (ej. Cocaína, morfinay alcohol). Presumiblemente, el incremento en la sobreexpresión de ΔFOSB, se correlaciona con la fosforilación en su residuo 27 de serina estabilizando la degradación de la proteína (Ulery-Reynolds, et al., 2006, 2009). Entre las acciones más sobresalientes de este factor se ha demostrado que es uno de los principales responsables de las neuroadaptaciones moleculares, en parte debido a la modulación de genes relacionados con la morfología neuronal [proteínas asociadas a microtúbulos, proteínas de citoesqueleto, proteínas de actina, ciclinas, etc.] (McClung y Nestler, 2003), genes importantes para la homeostasis de la señalización glutamatérgica [Genes de los receptores AMPA y la CaMKII] (Cornish y Kalivas, 2000; Robison, et al., 2011) y dopaminérgica [genes de los receptores de dopamina D1 y D2] (Volkow, et al., 2009), así como genes de proteínas remodeladoras de la cromatina [Histona desacetilasa 9 “HDAC9”] (Malik, et al., 2014). Todos estos genes cuya expresión se ha visto alterada principalmente en el NAc (Kalivas, 2009; Russo,

et al., 2010; Maze, et al., 2010), se han asociado directamente a la plasticidad neuronal (neuroadaptaciones) y señalización sináptica alterada (Figura 3) (Cornish y Kaliva, 2000; Li, et al., 2004; Koob y Volkow, 2010; Robison y Nestler, 2011) que conducen al comportamiento adictivo. Sin embargo, actualmente, los fundamentos moleculares de estos cambios estructurales aún no han sido totalmente esclarecidos, y se han ido sumado diversos factores capaces de controlar la transcripción de genes y la regulación de la cromatina. Estos incluyen a la proteína de unión a elementos cíclicos sensibles a AMP (CREB), el factor potenciador específico de miocitos 2 (MEF2), G9a y la DNA metiltransferasa 3A (DNMT3A), entre otros (Figura 3). Todos ellos propuestos como genes candidatos (firmas genéticas), por mostrar una alteración en su expresión, en ensayos de microarreglos de expresión global en distintos modelos de adicción a drogas y por su asociación directa con los cambios en la expresión génica de otros genes reguladores de la morfología neuronal, así como los comportamientos característicos de una adicción (Maze, et al., 2010; Robison y Nestler, 2011; Martin, et al., 2012; Russo y Nestler, 2013; Bannon, et al., 2014; Cadet, et al., 2015).

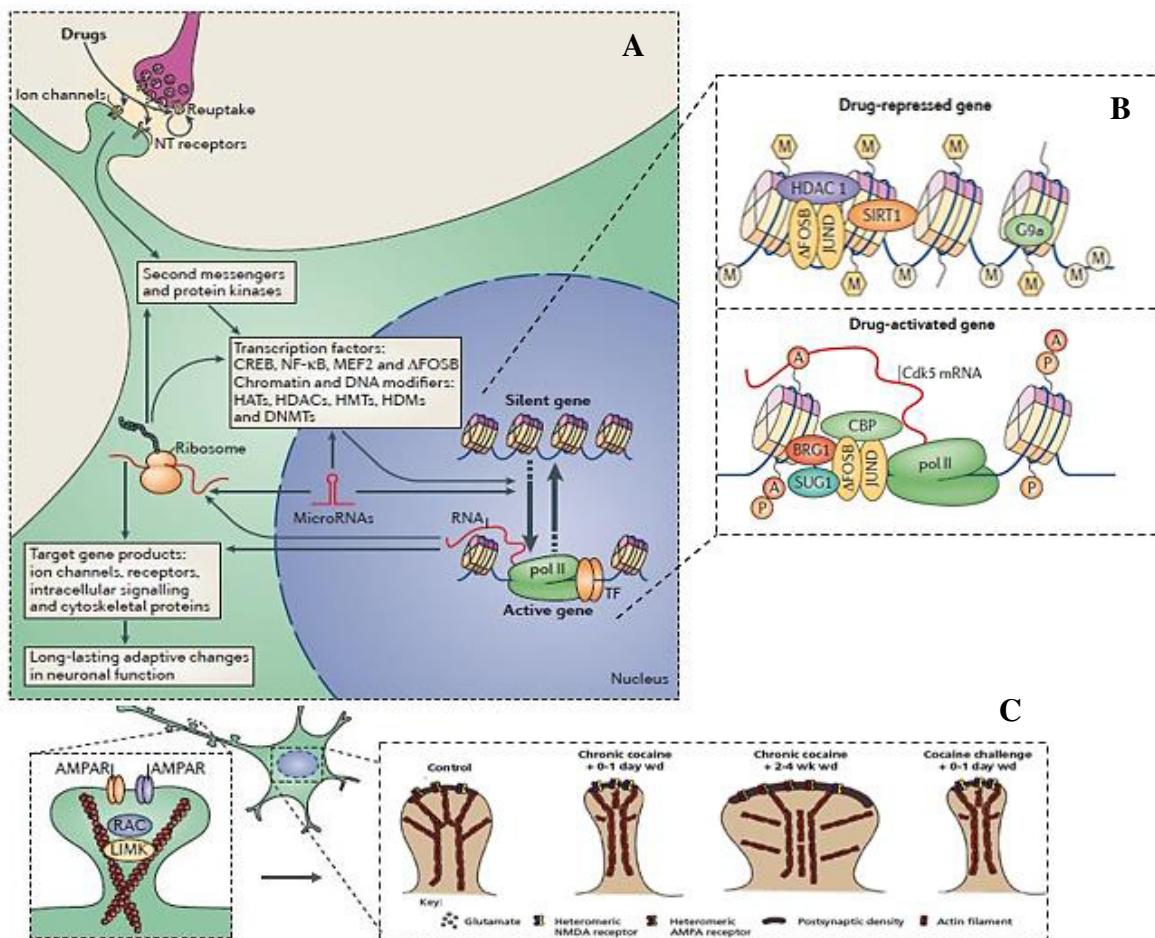


Figura 3. Mecanismos transcripcionales y epigenéticos de la adicción. **A.** Mecanismo de acción de las drogas (afección a canales de iones, re-captación de neurotransmisores, y alteración de sus receptores.); Señalización que desencadena la acción de la droga: activación selectiva de genes implicados en la patología de las adicciones; factores de transcripción, re-modeladores de la cromatina, los cuales alteran a su vez, la expresión de otros genes codificantes de receptores, canal de iones, señalización intracelular y proteínas del citoesqueleto. **B.** Modificaciones transcripcionales (activación de factores de transcripción y maquinaria transcripcional) y epigenéticas (modificación de histonas, metilación del DNA) responsables de las **C.** Modificaciones estructurales a nivel de sinapsis (alteración de la morfología neuronal -ampliación del área sináptica-, modificación de la cantidad de receptores). Todo esto consecuencia del consumo agudo y crónico de drogas.

*Modificada de Russo, et al, 2010; Robison y Nestler, 2011.

3.4. Correlaciones moleculares entre la adicción a las drogas y el consumo de comida. ¿Existe la adicción a la comida?

Al igual que en la adicción a diversas drogas, los alimentos apetecibles (ricos en azúcar y grasas), son capaces de activar regiones del sistema límbico que involucra los circuitos dopaminérgicos, los cuales, a su vez se ha demostrado que se alteran y aumenta la motivación

para la ingesta de alimentos hipercalóricos. Empleando modelos animales y estudios en seres humanos, se ha demostrado la activación del sistema de recompensa mediante imagen por resonancias magnéticas después de la exposición de imágenes de comida apetecible (Volkow, et al., 2002; Killgore, et al., 2003). Además, similar a las drogas, individuos obesos tienen niveles reducidos de receptores de dopamina D2 y que estos están inversamente relacionados con el peso corporal (Johnson y Kenny, 2010; Du y Nikola, 2016). Se propone que la falta de receptores de este tipo en regiones del circuito de la recompensa (principalmente el NAc) puede estar ligado a una ingesta compulsiva de comida (Johnson y Kenny, 2010; Hoffmann y Nikola, 2016). Adicionalmente, se ha identificado que la exposición crónica a una dieta hipercalórica, genera alteraciones en la expresión génica de áreas pertenecientes al circuito de la recompensa como lo son el NAc, el AVT, la CPF, la amígdala y el hipocampo, involucrando genes ya descritos en la adicción a drogas (ej. Receptores D1, D2, μ -opioide, CB1, gen de la tirosina hidroxilasa, BDNF) (Ong, et al., 2013; Martire, et al., 2014), y la participación de muchas de las regiones cerebrales y mecanismos neuroquímicos de la adicción a drogas (Volkow, et al., 2012; DiLeone, et al., 2012; Carter, et al., 2016).

Por otra parte, cabe destacar que, a diferencia de los genes candidatos de la adicción a drogas, los genes anteriormente mencionados y algunos nuevos propuestos como candidatos para el comportamiento adictivo hacia la comida, han sido evidenciados principalmente por ensayos de PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR), estudios de asociación del genoma completo (GWAS), estudios de neuroimagen, ensayos proteómicos como inmunoblot, inmunofluorescencia, wester blot, etc. A la fecha, no existe un análisis de expresión global empleando la tecnología de microarreglos del perfil de genes vinculado al desarrollo de adicción a la comida y su regulación por reprogramación fetal.

3.5. Herencia transgeneracional de un fenotipo.

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 et al., 2005; Guerrero-Bosagna y Skinner, 2012; Skinner 2011). 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 reprogramación fetal (Figura 4). Este tipo de reprogramación, pueden a su vez tener consecuencias funcionales en la descendencia durante el desarrollo y/o en la edad adulta, y provocar manifestaciones conductuales específicas que pueden transmitirse inclusive a generaciones posteriores sin el desencadenante causal inicial, a lo que se le conoce como herencia epigenética transgeneracional (Skinner 2011; Bohacek y Mansuy, 2015). Para el caso de su efecto a nivel del sistema nervioso, la reprogramación fetal puede modular el desarrollo y maduración del cerebro y, por lo tanto, alterar su estructura original y establecer un nuevo proceso conocido como reprogramación (Bale, et al., 2010).

De acuerdo con la hipótesis de Barker (2001), la reprogramación del neurodesarrollo induce adaptaciones en un entorno temprano (reprogramación fetal/gestacional) en previsión de un entorno postnatal similar. Por lo tanto, cuando existe una perturbación entre estos dos entornos (pre- y postnatal), tal reprogramación puede aumentar el riesgo de enfermedad. Por ejemplo, la exposición a la nicotina durante la gestación, es uno de los modelos más estudiados y se ha correlacionado con varios resultados fisiológicos y psicosociales negativos, incluyendo un mayor riesgo de comportamientos aberrantes que implican alteraciones en la atención, así como un mayor riesgo de la descendencia para desarrollar dependencia a la droga. Estos cambios correlacionan con la alteración de la expresión génica de diversos genes (ej. CaMKIIα, GluA1 y GluA2) relacionados con el comportamiento adictivo (McNair y Kohlmeier, 2015).

Por otra parte, en modelos de adicción a drogas como la cocaína, se ha evidenciado que la exposición de padres a la droga, genera cambios epigenéticos en la línea germinal, que involucran genes y mecanismos ya relacionados con el comportamiento adictivo (BDNF, modificación de histonas, metilación del DNA), los cuales promueve la herencia del fenotipo adictivo a la descendencia, Figura 4 (Vassoler et al., 2013; Sadri-Vakili, 2015). Además de generar alteraciones conductuales como un déficit de aprendizaje en la descendencia (Machos y Hembras) proveniente de padres expuestos a cocaína (He et al., 2006; Killinger et al., 2012). Igualmente, en modelos de adicción a la morfina, la exposición de ratas a esta droga durante la adolescencia, se ha visto que aumenta la ansiedad en la descendencia femenina en etapas adultas y una conducta diferencialmente alterada en respuesta a la morfina en ambos sexos (Byrnes, 2005; Byrnes, 2011). Lo anterior como probable consecuencia de neuroadaptaciones en la señalización de dopamina en el núcleo accumbens (Byrnes et al., 2013).

En su conjunto, se sugieren que la reprogramación fetal inducida por el consumo de drogas, o exposición a estrés en los padres, influye en la fisiología y el comportamiento de las

generaciones futuras. Sin embargo, la etapa de mayor susceptibilidad para sufrir alteraciones, aún permanece sin esclarecer. Esto debido a que las evidencias sugieren que los cambios se pueden promover independientemente del momento en que ocurrieron durante el desarrollo (Bale, 2015).

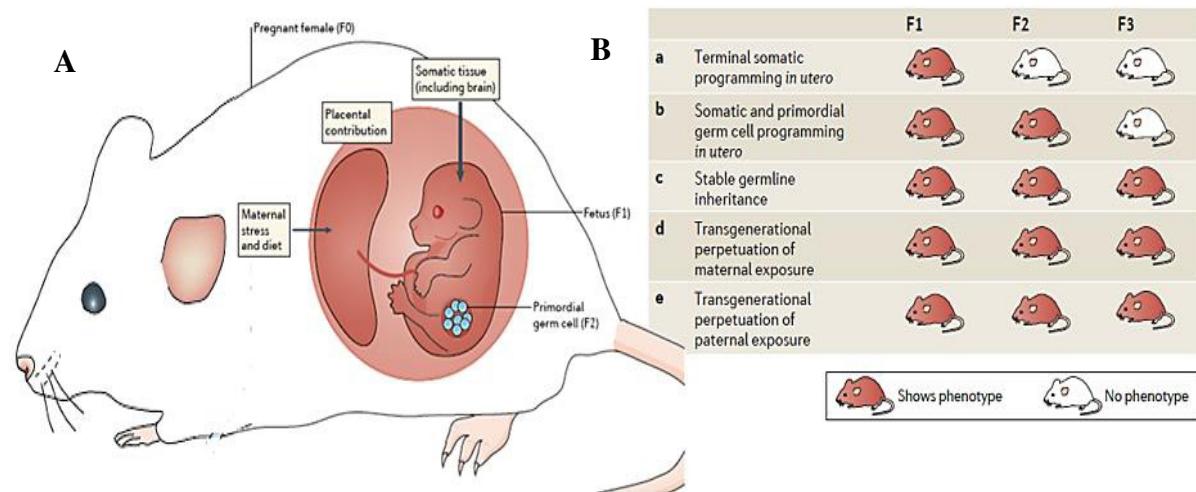


Figura 4. Reprogramación fetal y modelos de herencia transgeneracional. **A.** Factores externos como la dieta materna y el estrés, pueden alterar el ambiente intrauterino promoviendo una reprogramación fetal a diversos niveles (células somáticas y germinales del embrión), lo cual puede tener repercusión en el estado de salud de la descendencia durante el desarrollo o en etapas posteriores de la vida. **B.** Modelos de herencia transgeneracional, según el nivel de reprogramación o exposición al estímulo causal: a) Reprogramación en células somáticas terminales, perpetuación del fenotipo solo hasta generación F1. b) Reprogramación en células somáticas y células germinales primordiales, transmisión del fenotipo hasta generación F2. c) Reprogramación estable de células germinales, herencia perpetua hasta generaciones F3. d) Herencia perpetuada por exposición materna al estímulo causal del fenotipo. e) Herencia perpetuada por exposición paterna al estímulo causal del fenotipo.

*Modificada de Bale, 2015.

3.5.1 Mecanismos moleculares de la transmisión del fenotipo adictivo a la descendencia.

Hasta ahora sabemos que los correlativos entre el consumo excesivo de alimentos hipercalóricos (ricos en grasa y azúcar) y el consumo de drogas adictivas, ha llevado a algunos científicos y clínicos a sugerir que la obesidad puede ser una forma de "adicción a la comida"(Volkow y Wise, 2005; Volkow, et al., 2011; Volkow, et al., 2012; Kenny, 2011). La persistencia de cambios en el comportamiento sugiere que la modulación de la expresión génica en determinadas regiones del cerebro es estable, y pueden contribuir de manera importante al fenotipo de la adicción. En este respecto, diversas investigaciones en la última década han

demostrado un papel crucial de los mecanismos epigenéticos en el establecimiento de cambios duraderos en la expresión génica, entre los que destacan: la modificación de las colas de histonas (acetilación, metilación y fosforilación, principalmente), la metilación del DNA y los microRNAs (Nestler, 2013).

a) Mecanismos epigenéticos y su importancia en la trasmisión del fenotipo adictivo.

La epigenética, puede ser definida como una serie de procesos bioquímicos a través de los cuales se ejercen cambios en la expresión génica durante todo el ciclo de vida de un organismo, sin cambiar la secuencia del DNA (Jaenisch y Bird, 2003).

La acetilación de histonas, es la modificación de la cromatina más estudiada en los modelos de adicción a drogas. Múltiples tipos de drogas, inducen cambios en la acetilación de las histonas, promoviendo así la descondensación de la cromatina y permitiendo la activación transcripcional de los genes (Maze y Nestler, 2011). En el núcleo accumbens, se ha observado que después de una exposición aguda o crónica a cocaína y otros estimulantes (Kumar et al., 2005; Schroeder et al., 2008; Shen et al., 2008), existe un incremento en la acetilación global de las histonas H3 y H4. Esto podría explicar la sobreexpresión de diversos genes involucrados en la patología del proceso adictivo. Por ejemplo, el incremento de c-Fos, consecuencia de la acetilación de la H4, y el incremento del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la ciclina dependiente de kinasa 5 (Cdk5) y la CaMKII α , a consecuencia de la acetilación de la H3 (Kumar et al., 2005; Renthal et al., 2008; Robison et al., 2013).

Por otra parte, la metilación del DNA se asocia a la represión de la transcripción de los genes en el DNA, mediante el reclutamiento de complejos co-represores (por ejemplo, HDACs y HMT) que pueden obstaculizar estéricamente la maquinaria transcripcional o modificar la estructura de los nucleosomas (Nestler, 2013). Al igual que la acetilación de histonas, dicho mecanismos se ha visto involucrado en la alteración de la expresión de genes específicos involucrados en las modificaciones estructurales patológicas de las adicciones. Por ejemplo, la proteína de unión a islas CpG metiladas 2 (MeCP2), una proteína que se une a DNA metilado y contribuye a la represión de la expresión génica, se sugiere reprime la transcripción específica de algunos microRNAs, dando como resultado la represión del factor BDNF (Im, et al., 2010). Además, MeCP2 se involucra en modificaciones neuronales y el aumento o la disminución del consumo de drogas, dependiente de su sobreexpresión o subexpresión, respectivamente, en el Núcleo accumbens (Im, et al., 2010; Deng, et al., 2010; Host, et al., 2011).

Las modificaciones moleculares asociadas al desarrollo del comportamiento aberrante en las adicciones representan eventos clave en la transmisión del fenotipo adictivo de padres a hijos (Bale, 2015; Bohacek y Mansuy, 2015), como se describe a continuación.

3.6. Reprogramación metabólica por nutrientes y transmisión del comportamiento compulsivo hacia su ingesta, a la descendencia.

Al igual que en la reprogramación y herencia transgeneracional observada en el comportamiento adictivo hacia drogas de abuso, se ha observado que la exposición de madres a una dieta alta en grasa durante la gestación, es capaz de generar cambios en la regulación de los sistemas dopaminérgicos en el NAc, induciendo alteraciones en el comportamiento. Por ejemplo, la descendencia muestra un incremento en el comportamiento motivante similar a lo observado con el consumo de diversas drogas (Naef, et al., 2011). Por otra parte, Gugusheff y colaboradores. 2016, mencionan que el consumo de dieta hipercalórica durante diferentes períodos del desarrollo (durante la gestación o la lactancia), generan en la descendencia una preferencia por dietas apetecibles (hipercalóricas), lo cual podría ser consecuencia de alteraciones en el sistema de señalización de opioides en regiones del sistema de la recompensa, por ejemplo, el NAc y el AVT. Además, la programación metabólica por nutrientes hipercalóricos y/o el estado metabólico de la madre empleando modelos animales y en humanos, han demostrado que puede afectar el ambiente intrauterino y tener efectos posteriores en el comportamiento de su descendencia, entre los que destacan la presencia de ansiedad, depresión, déficit de atención y desorden de hiperactividad, así como trastornos del espectro autista (Sullivan, et al., 2014; Warneke, et al., 2014; Rijlaarsdam, et al., 2016). De interés, la mayoría de las investigaciones coinciden en que dichas alteraciones en el comportamiento por exposición a dietas hipercalóricas son debidas a eventos de regulación epigenética similares a los descritos en la reprogramación del comportamiento adictivo (Donkin, et al., 2016; Wu, et al., 2016; Holland, et al., 2016).

Por todo lo anterior, la obesidad puede contemplarse como un padecimiento cuyas evidencias han concebido la existencia de un comportamiento aberrante semejante a la adicción y motivación para el consumo de alimentos con elevado valor calórico. Sin embargo, hace falta evidencia que sustente que los alimentos hipercalóricos representan realmente elementos adictivos y a la obesidad como consecuencia de un comportamiento aberrante similar a la adicción, el cual pueda, además ser transmitido a la descendencia.

La mayoría de los estudios previos en el área, han empleado tecnologías como ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR), estudios de asociación del genoma completo (GWAS), estudios de neuroimagen, ensayos proteómicos como inmunoblot, inmunofluorescencia, western blot, etc., herramientas muy limitadas o que requieren un número de muestras muy amplio para obtener un resultado. Por lo cual, en este proyecto se propone el uso de microarreglos de expresión global, con el fin de caracterizar de manera amplia los cambios en la expresión génica en el núcleo accumbens en la descendencia de ratas Wistar con adicción a la comida hipercalórica.

IV. HIPÓTESIS

La reprogramación fetal por exposición a dieta hipercalórica genera cambios en el perfil de expresión génica en la descendencia de ratas Wistar, incrementando su motivación para la búsqueda de recompensas naturales.

V. OBJETIVOS

i. Objetivo General

Caracterizar el perfil de expresión génica del núcleo accumbens dado por reprogramación fetal, en la descendencia de ratas madres con/sin exposición a dieta hipercalórica.

ii. Objetivos Específicos

- 1) Establecer un modelo de adicción a la comida hipercalórica empleando condicionamiento operante.
- 2) Caracterizar los cambios en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens generados por reprogramación fetal, en la descendencia de ratas madres con/sin exposición a comida hipercalórica
- 3) Proponer una firma de genes candidatos implicados en la adicción a la comida.
- 4) Correlacionar el comportamiento observado en F1 de ratas Wistar con adicción a la comida hipercalórica y los genes candidatos de la firma genómica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

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).
• Estuche de disección.
• Mouse Brain Atlas, Paxinos y Watson.
• Vaso de precipitado de 50ml y 100ml.
• Guillotina para roedores.
• Micropipetas eppendorf de 1000µl, 100µl, 10µl.
• Puntillas para micropipetas: azules, amarillas y blanca, estériles.
• Tubos eppendorf de 1.5 ml, 0.6 ml y 0.2, estériles.
• Tubos Falcon 50ml y 15ml, estériles.
• Guantes sin talco.
• Gradillas de plástico.
Biológico
• Ratas Wistar.
Sexo: machos y hembras.
Peso: 250-300 gramos.
Edad: 8 – 10 semanas.

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).
- Agarosa grado molecular (BioRad/ No. Catálogo 1613102).
- Dietil pirocarbonato 97% (Sigma Aldrich/ No. Catálogo D5758).
- Tris (BioRad/No. Catálogo 1610716).
- EDTA (Sigma Aldrich/ No. Catálogo E9884).
- Ácido bórico (Sigma Aldrich/ No. Catálogo B0394).
- GelRed (Biotium/ No. Catálogo 41003).
- Chips de electroforesis Bioanlyzer: RNA nano chip para el Bioanalyzer 2100.
- Kit de extracción de RNA: RNeasy Mini kit (50) (QIAGEN/ No. Catálogo 74104).
- Microarreglos de expresión: GENECHIP® RAT TRANSCRIPTOME PICO ASSAY 1 (Affymetrix/ No. Catálogo A02-902665).

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.
- Thermomixer confort (Eppendorf).
- Cámara de electroforesis: Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad).
- Fuente de poder: PowerPac™ Basic Power Supply (BioRad).
- Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).
- Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).
- GeneChip Fluidics Station 450 (Thermo Fisher).
- GeneChipTM Hybridization Oven 645 (Thermo Fisher).
- GeneChipTM Scanner 3000 7G (Thermo Fisher).
- GeneAtlasTM Hybridization Station (Thermo Fisher).

i. Estrategia Experimental

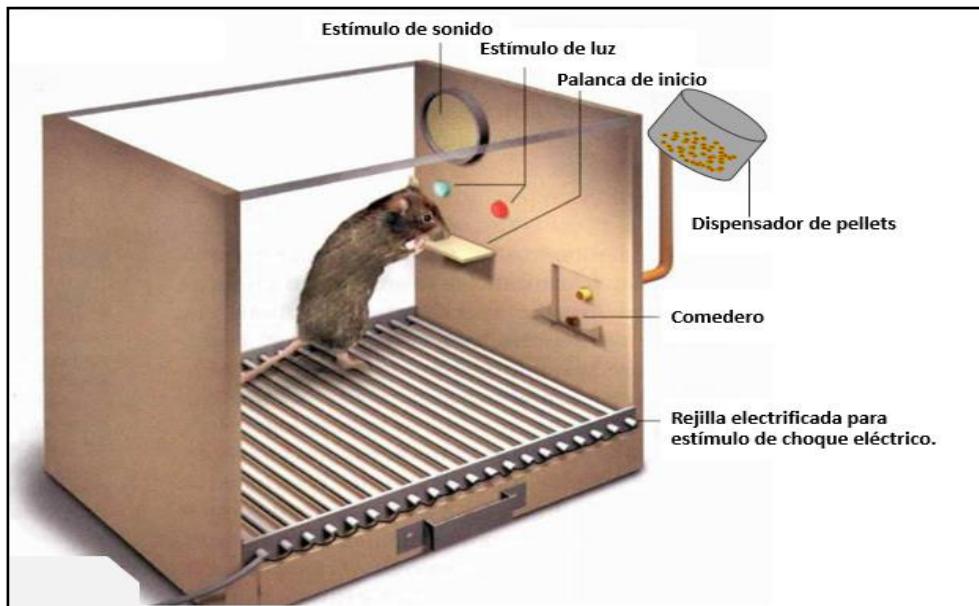
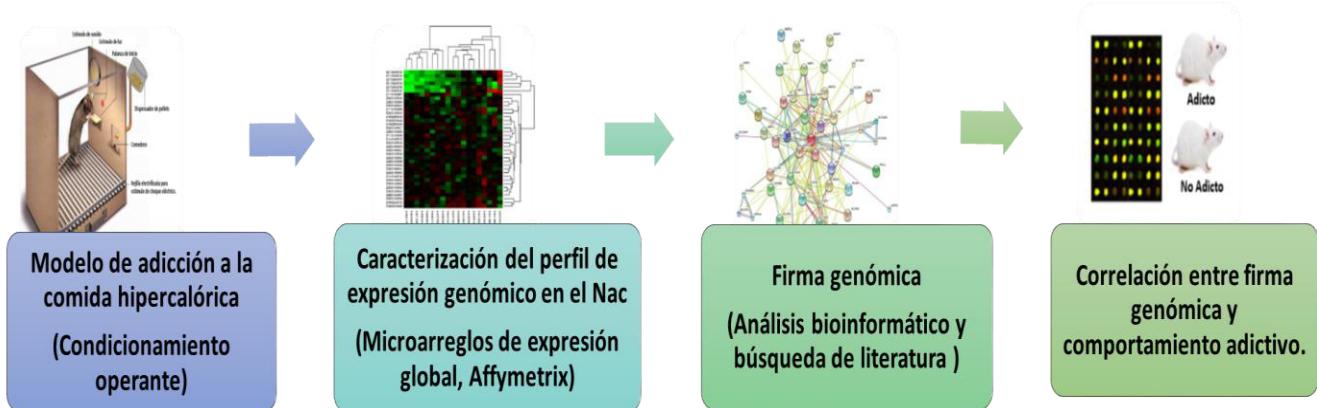


Figura 5. Descripción gráfica de los componentes de la caja de comportamiento operante (caja de Skinner).

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 dichos estímulos (respuesta condicionada).

iii. Metodología.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar; machos y hembras de 8 – 10 semanas de edad y un peso entre 250 y 300 gramos.

a) Condicionamiento operante.

1. Se separó cada grupo experimental de ratas (8-9 ratas) en cajas individuales.
2. Se sometió a restricción calórica a cada grupo de ratas antes de comenzar el entrenamiento. Contemplando que las ratas comen diariamente el 10% de su peso (25-30g), sólo se les proporcionó 15 gramos de comida control por día, durante 7 días.
3. Las ratas se sometieron a prueba de entrenamiento de condicionamiento operante siguiendo protocolos establecidos (Sharma, et al., 2012) y las indicaciones del fabricante de la caja de entrenamiento OmniAlva (Figura 5).
4. Las ratas se entrenaron individualmente siguiendo los protocolos FR1, FR5 y PR, con los parámetros de asociación a: 2 segundos de luz y 2 segundos de sonido con 5 segundos de inter-ensayo, ajustados a la liberación del pellet en el receptáculo de la caja (Figura 6).
5. La duración de cada protocolo es el siguiente:
 - Protocolo FR1 por 3 días consecutivos; duración 1 hora.
 - Protocolo FR5 por 4 días consecutivos; duración 1 hora.
 - Protocolo PR por 5 días consecutivos; duración dependiendo de la actividad del animal, máximo 1 hora.
$$PR = [5e^{(R*0.2)}] - 5$$
, en donde R es igual al número de recompensas ganadas menos 1. Con ello, se requiere el siguiente orden de estimulación en la palanca para ganar una recompensa: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, etc.,
6. Se colocó la cantidad de comida estándar correspondiente, a cada rata, después de terminado cada protocolo.
 - Después de protocolo FR1 se expuso a 30 gramos de comida estándar ad libitum.
 - Después de protocolo FR5: se expuso a comida estándar ad libitum.
 - Después de protocolo PR: se expuso a comida estándar ad libitum.

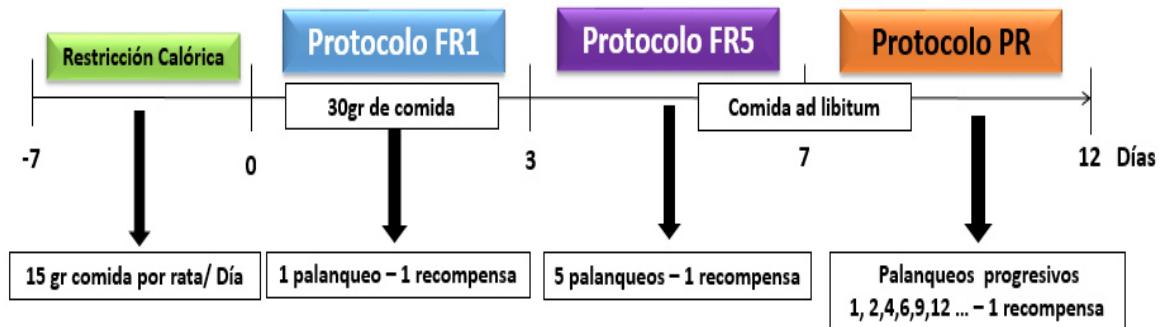


Figura 6. Esquema de protocolo completo para el entrenamiento de condicionamiento operante en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.

Se generaron diversos grupos experimentales: cuatro grupos principales (2 grupos de machos y 2 grupos de hembras), los cuales conformaron la generación F0 del proyecto. La F1 se conformó por ocho grupos de machos generados a partir de los cuatro grupos de la F0, después de ser subdivididos según la clasificación del comportamiento operante observado; 4 grupos de machos provenientes de padres/madres no adictos y 4 grupos de machos provenientes de padres/madres adictos (Figura 7).

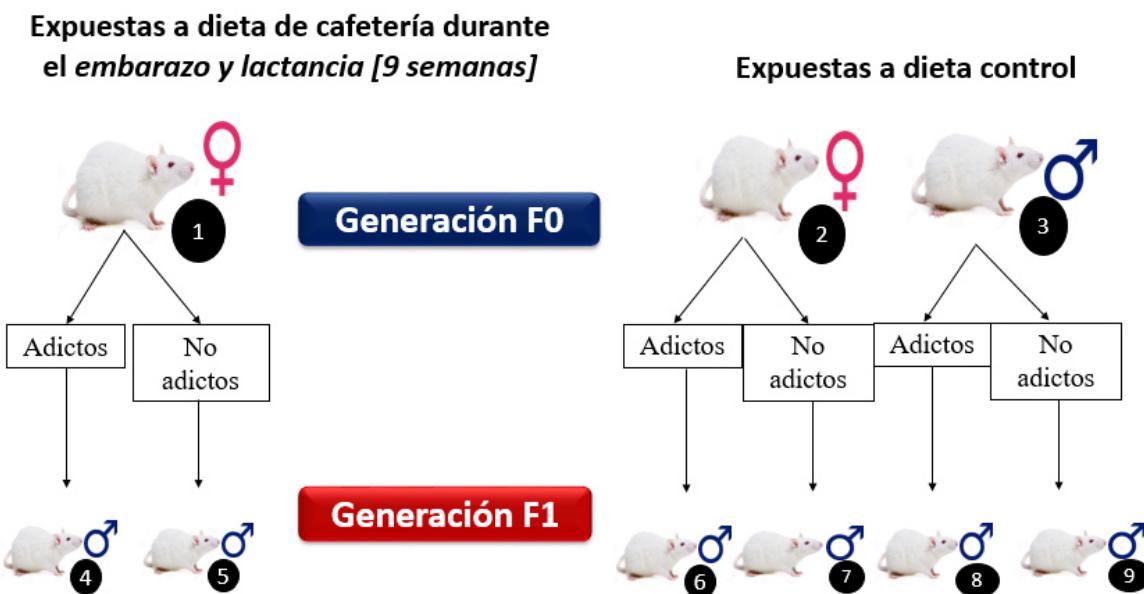


Figura 7. Árbol genealógico de la obtención de los grupos experimentales, con base en el tiempo de exposición al estímulo recompensante y el comportamiento observado en la caja de condicionamiento operante.

b) Obtención y almacenamiento de muestras.

1. Los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina posterior a cada entrenamiento.
2. Se obtuvo la región del núcleo accumbens, siguiendo las coordenadas de localización de la región que se especifican en el “Mouse brain atlas” de Paxinos y Watson (Figura 8).
3. Se colocaron las muestras de tejido en 200 μ l de solución estabilizadora de RNA: RNAlater y se almacenaron a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se preservaron a -20°C hasta su posterior uso.
4. Se retiró el exceso de RNAlater con una micropipeta de 100 μ l y se añadió 350 μ l de buffer de lisis (Buffer RLT) proporcionado por el kit: RNeasy Mini Kit de QIAGEN a cada tubo con la muestra sin solución RNAlater.
5. Se colocó en el tubo en hielo y se sometió 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.

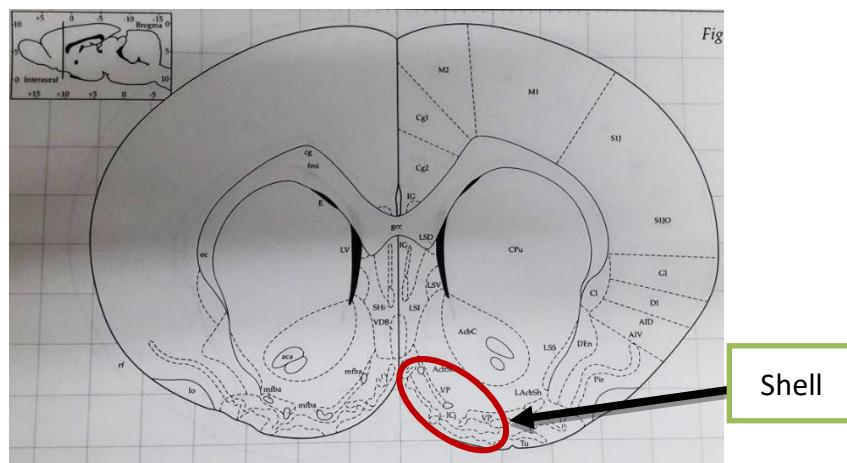


Figura 8. Ilustración del corte y coordenadas de localización para la región del núcleo accumbens shell en el cerebro de roedores, tomadas del atlas de Paxinos y Watson.

c) Microarreglos de expresión.

1. Se cuantificó la concentración de RNA por NanoDrop (250ng concentración óptima de RNA para comenzar el microarreglo) y evaluar la calidad del RNA (rango óptimo 1.7-2.1, en la relación 260/280)
2. Se evaluó la integridad del RNA mediante chips: RNA nano chip para el Bioanalyzer 2100 (RIN= 6-10).
3. Se prepararon los controles de RNA internos del chip (1 mg/ml total RNA de células HeLa)
 - En hielo, se agregaron 2 μ l del control de RNA en 78 μ l de agua libre de RNAsas para un volumen final de 80 μ l (25ng/ μ l).
4. Se prepararon los stocks de los controles de Poly-A RNA, según la concentración de RNA de inicio (250ng):

Tabla 4. Diluciones seriadas de los stocks de Poly-A RNA

Concentración de RNA de inicio	1ra dilución	2da dilución	3ra dilución	4ta dilución
250 ng	1:20	1:50	1:50	1:4

- En un tubo de 0.6ml, se añadieron 2 μ l del control de Poly-A RNA en 38 μ l de dil buffer para una relación 1:20 (1ra Dilución).
- De la 1ra dilución se tomaron 2 μ l y se añadieron a 98 μ l de dil buffer para generar la 2da dilución 1:50.
- De la 2da dilución se tomaron 2 μ l y se agregaron 98 μ l de dil buffer para generar la 3ra dilución 1:50.
- De la 3ra dilución se tomaron de nuevo 2 μ l y se añadieron 6 μ l de dil buffer para la 4ta dilución 1:4.

5. Se preparó el master mix para el control de RNA total/Poly-A RNA; para el total de muestras a procesar.

Tabla 5. Componentes para 1 reacción de control de RNA total/Poly-A RNA	
Componentes	Volumen
RNA total de la muestra	variable
Dilución de controles Poly-A RNA (4ta dilución)	2μl
Agua libre de nucleasas	variable
Volumen final	5μl

*Para la reacción control de RNA control del Kit:

- En un tubo de 0.6ml, se añadieron 2μl del stock de RNA control (25ng/μl células HeLa) para una concentración de RNA de 50ng/μl.
- Se agregaron 2μl de los controles de Poly-A RNA (4ta Dilución).
- Finalmente, se agregó 1 μl de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 5μl.

6. Se preparó el master mix para la síntesis de la primera cadena de cDNA, suficiente para el número de muestras a procesar, con un exceso del 10%.

Tabla 6. Componentes 1 reacción de síntesis de la 1ra cadena de cDNA.	
Reactivos	Volumen
Buffer de la primera cadena	4μl
Encima de la primera cadena	1μl
Volumen final	5μl

7. Se transfirieron los 5μl del master mix para la síntesis de la primera cadena de cDNA a cada una de las muestras de 5μl de RNA total preparado en el paso 5. Esto para obtener un volumen final de 10μl. Se mezcló bien y se centrifugó a spin.
8. Se incubaron por 1 hora a 25° C, después 1 hora a 42°C y finalmente 2 minutos a 4°C.
9. Las muestras se incubaron en el termociclador bajo las especificaciones del Kit para la síntesis de la primera cadena de cDNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
10. Inmediatamente terminada la síntesis, se dio un spin y se incubaron en hielo por 2 minutos.
11. Se procedió inmediatamente con la síntesis de la segunda cadena de cDNA.

12. Se preparó el master mix para la síntesis de la segunda cadena de cDNA, suficiente para el número de muestras a procesar y un 10 % de exceso.

Tabla 7. Componentes para 1 reacción de síntesis de la 2da cadena de cDNA.	
Reactivos	Volumen
Buffer de la segunda cadena	18μl
Encima de la segunda cadena	2μl
Volumen final	20μl

13. Se mezcló todo por vortex rápido y se centrifugó spin.
14. En hielo, se transfirieron 20μl del master mix de la síntesis de la segunda cadena a cada uno de los 10μl de las muestras de la primera cadena de cDNA (volumen final 30μl). Se mezcló y centrifugó a spin.
15. Se incubó por 1 hora a 16°C, después 10 minutos a 65°C, finalmente 2 minutos a 4°C.
16. Posteriormente se incubaron las muestras en termociclador bajo las especificaciones del kit para la amplificación de la segunda cadena de cDNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
17. Inmediatamente después de la síntesis, las muestras se colocaron en hielo.
18. Se procedió con la reacción de síntesis de cRNA por transcripción in vitro.

Síntesis de cRNA por transcripción in vitro (IVT).

1. A temperatura ambiente, se preparó el master mix para la IVT suficiente para el número de muestras a procesar.

Tabla 8. Componentes para 1 reacción de IVT	
Componentes	Volumen
IVT Buffer	24μl
Encima IVT	6μl
Volumen final	30μl

2. Se mezcló y centrifugó a spin.
3. Se transfirieron los 30μl de la reacción de IVT a los 30μl de la segunda reacción de síntesis de cDNA (volumen final 60μl). Se mezcló bien y se centrifugó a spin.
4. Las muestras se incubaron por 16 horas a 40°C, después a 4°C.

5. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en el termociclador bajo las especificaciones del kit para la síntesis In vitro del cRNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
6. Después de la incubación, se centrifugó a spin y se procedió con la purificación del cRNA.

Purificación de la doble cadena de cDNA.

1. Se mezcló por vortex el contenedor de las perlas magnéticas para re-suspenderlas.
2. Se añadieron 100 μ l de las perlas a cada una de las muestras de cRNA (60 μ l) del paso anterior; se mezclaron por pipeteo y se transfirió todo a una placa de pozos con fondo en forma de U.
3. Se volvió a mezclar todo por pipeteo 10 veces.
4. Se incubaron las muestras por 10 minutos para permitir que el cRNA se uniera a las perlas de purificación.
5. Se colocó la placa sobre un imán para capturar las perlas (~5 minutos). La mezcla se volvió transparente y las perlas se concentraron cerca del imán.
6. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante, sin remover las perlas.
7. Se lavaron las perlas, aun sobre el imán, agregando 200 μ l de etanol al 80% a cada pozo y dejando reposar por 30 segundos.
8. Se retiró el sobrenadante, sin remover las perlas.
9. Se repitieron los pasos 7 y 8 hasta completar 3 lavados.
10. Se dejaron secar al aire libre por 5 minutos, hasta que no hubiera líquido visible.
11. Se eluyó el cRNA, removiendo la placa del imán y agregando 27 μ l de agua libre de RNAsas precalentada (65°C) y dejando reposar por 1 minuto.
12. Se mezcló bien todo por pipeteo 10 veces.
13. Se colocó nuevamente la placa sobre el imán por 5 minutos para capturar las perlas.
14. Se transfirió el sobrenadante que contiene el cRNA a un tubo libre de RNAsas.
15. Se colocó el cRNA purificado en hielo y se procedió con la evaluación del rendimiento del cRNA.
16. Se cuantificó la concentración de cRNA por NanoDrop a 260nm. Usando 1.0 μ l de cada muestra y agua libre de nucleasas como blanco.

17. Se ajustaron las muestras a una concentración de 15 μ g de cRNA para la segunda reacción de síntesis de cDNA.

Segunda síntesis de cDNA de cadena sencilla.

1. En hielo, se prepararon 625ng/ μ l de cRNA que corresponden a 15 μ g en 24 μ l luego se ajustaron con agua libre de nucleasas para un volumen de 24 μ l.
2. Se preparó el cRNA y el mix para el segundo ciclo de amplificación de cDNA. En hielo y se mezcló bien:
 - 24 μ l de cRNA (15 μ g)
 - 4 μ l de primers para el segundo ciclo.
3. Se incubó por 5 minutos a 70°C, después 5 minutos a 25°C, finalmente 2 minutos a 4°C.
4. Las muestras se incubaron en el termociclador bajo las condiciones para la segunda síntesis de cDNA.(Tabla de programas en termociclador, en anexos).
5. Inmediatamente después de la incubación, las muestras se centrifugaron a spin y se colocaron en hielo.
6. Se preparó el master mix para el segundo ciclo de la ss-cDNA, como lo indica el kit, suficiente para el número de muestras a procesar:

Tabla 9. Componentes 1 reacción del 2do ciclo de la ss-cDNA	
Componentes	Volumen
Buffer 2nd-Cycle ss-cDNA	8 μ l
Enzima 2nd-Cycle ss-cDNA	4 μ l
Volumen final	12 μ l

7. Se mezcló bien todo y se centrifugó a spin.
8. En hielo, se trasfirieron los 12 μ l de la reacción del 2do ciclo de la ss-cDNA a cada una de las muestras del paso anterior (28 μ l) para un volumen final de 40 μ l. se mezcló todo y se centrifugó a spin.
9. Se incubaron por 10 minutos a 25°C, después 90 minutos a 42°C, posteriormente 10 minutos a 70°C, finalmente 2 minutos a 4°C.

10. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en el termociclador bajo las condiciones para el 2do ciclo de la ss-cDNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
11. Inmediatamente después de la incubación, las muestras se centrifugaron a spin y se colocaron en hielo para proceder con la hidrólisis del RNA.

Hidrólisis del RNA usando RNAsa H.

1. En hielo, se añadieron 4 μ l de RNAsa H a cada muestra del paso anterior (40 μ l) para un volumen final de 44 μ l. Se mezcló bien y se centrifugó a spin.
2. Las muestras se incubaron por 45 minutos a 37°C, después 5 minutos a 95°C, finalmente 2 minutos a 4°C.
3. Posteriormente se incubaron en el termociclador bajo las condiciones para la hidrólisis del RNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
4. Inmediatamente después, las muestras se centrifugaron a spin y se colocaron en hielo.
5. Se agregaron 11 μ l de agua libre de nucleasas a cada muestra (44 μ l), para un volumen final de 55 μ l. Se mezcló y se centrifugó a spin. Se colocaron en hielo y se procedió con la 2da purificación del ss-cDNA.

Purificación del segundo ciclo de síntesis de ss-cDNA.

1. Se mezcló por vortex el contenedor de las perlas magnéticas para re-suspenderlas.
2. Se añadió 100 μ l de las perlas a cada una de las muestras de ss-cDNA (55 μ l) del paso anterior; se mezcló por pipeteo y se transfirió todo a una placa de pozos con fondo en forma de U.
3. Se añadieron 150 μ l de etanol al 100% a cada muestra y se mezcló nuevamente por pipeteo 10 veces.
4. Se incubaron por 20 minutos para permitir que el ss-cDNA se uniera a las perlas de purificación.
5. Se colocó la placa sobre un imán para capturar las perlas (~5 minutos). La mezcla se volvió transparente y las perlas se concentraron cerca del imán.
6. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante, sin remover las perlas.
7. Se lavaron las perlas, aun sobre el imán, agregando 200 μ l de etanol al 80% a cada pozo y dejando reposar por 30 segundos.

8. Se retiró el sobrenadante, sin remover las perlas.
9. Se repitieron los pasos 7 y 8 hasta completar 3 lavados.
10. Se dejó secar al aire libre por 5 minutos, hasta que no hubiera líquido visible.
11. Se eluyó el ss-cDNA, removiendo la placa del imán y agregando 30μl de agua libre de Nucleasas precalentada (65°C), dejando reposar por 1 minuto.
12. Se mezcló todo por pipeteo 10 veces.
13. Se colocó la placa nuevamente sobre el imán por 5 minutos para capturar las perlas.
14. Se transfirió el sobrenadante que contiene el ss-cDNA a un tubo libre de nucleasas y se colocó en hielo.
15. Se procedió con la evaluación del rendimiento del ss-cDNA.
16. Se cuantificó la concentración de ss-cDNA por NanoDrop a 260nm. Usando 1.5μl de cada muestra y agua libre de nucleasas como blanco. Una concentración inicial de cRNA de 15μg, tiene como rendimiento aproximado de 5.5-15μg de ss-cDNA.

Fragmentación y marcaje de ss-cDNA con Biotina.

1. Se preparó 5.5μg de ss-cDNA.
 - En hielo, se prepararon 176ng/μl de ss-cDNA, lo cual corresponde a 5.5μg de ss-cDNA en un volumen de 31.2μl o se ajustó con agua libre de nucleasas para llevar el ss-cDNA a un volumen de 31.2μl.
2. Se preparó el master mix para la fragmentación, suficiente para el número de muestras a procesar, con un exceso del 10%:

Tabla 10. Componentes para 1 reacción de Fragmentación.	
Componentes	Volumen
Agua libre de nucleasas	10μl
Buffer de fragmentación de cDNA 10X	4.8μl
UDG, 10 U/μl	1μl
APE 1, 1,000 U/μl	1μl
Volumen final	16.8μl

3. Se mezcló y se centrifugó a spin.

4. En hielo, se transfirieron los 16.8 μ l del master mix de fragmentación a cada una de las muestras de ss-cDNA purificado (31.2 μ l), para un volumen final de 48 μ l. Se volvió a mezclar y se dio un spin.
5. Las muestras se incubaron por 1 hora a 37°C, después 2 minutos a 93°C, finalmente 2 minutos a 4°C.
6. Posteriormente se incubaron en el termociclador bajo las condiciones para la fragmentación del ss-cDNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
7. Inmediatamente después de la incubación, se centrifugó todo a spin y se colocaron las muestras en hielo.
8. En hielo, se trasfirieron 45 μ l del ss-cDNA fragmentado a un tubo libre de nucleasas.
9. Se preparó el master mix de marcaje, suficiente para el número de muestras a procesar, con un exceso del 10%:

Tabla 11. Componentes para 1 reacción de marcaje.	
Componentes	Volumen
Buffer TdT 5X	12 μ l
Reactivos de marcaje de DNA, 5 mM	1 μ l
TdT, 30 U/ μ l	2 μ l
Volumen total	15 μ l

10. Se mezcló bien todo y se centrifugó a spin.
11. En hielo, se transfirieron los 15 μ l del master mix de marcaje a cada una de las muestras del paso anterior (45 μ l), para un volumen final de 60 μ l. Se mezcló de nuevo y se centrifugó a spin.
12. Las muestras se incubaron por 1 hora a 37°C, después 10 min a 70°C, finalmente 2 minutos a 4°C.
13. Posteriormente se incubaron en el termociclador bajo las condiciones para el marcaje del ss-cDNA (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
14. Inmediatamente después de la incubación, se centrifugó todo a spin y se colocaron las muestras en hielo. Se procedió con la hibridación en el microarreglo.

Hibridación del microarreglo.

1. Se preparó el master mix de hibridación, suficiente para el número de muestras a procesar, más un 10% de exceso (temperatura ambiente):
 - Se pre-calentaron los controles de hibridación 20X por 5 minutos a 65°C.

Tabla 12. Componentes para 1 reacción de hibridación.

Componentes	Volumen
ss-cDNA fragmentado y marcado	5.2µg
Control Oligo B2 (3 nM)	3.7µl
Controles de hibridación 20X	11µl
Mix de hibridación 2X	110µl
DMSO	15.4µl
Agua libre de nucleasas	19.9µl
Volumen final	160µl

2. Se mezclaron bien y se centrifugaron a spin.
3. Se preparó el cocktail de hibridación. A temperatura ambiente, se agregó la cantidad apropiada de master mix de hibridación a cada muestra de ss-cDNA fragmentado y marcado, esto para preparar el cocktail de hibridación.

Tabla 13. Cocktail de hibridación para 1 muestra.

Componentes	Volumen
Master mix de hibridación	160µl
ss-cDNA fragmentado y marcado	~60µl (5.2µg)
Volumen final	220µl

4. Se mezcló bien y se centrifugó a spin.
5. Se incubó el cocktail de hibridación por 5 minutos a 99°C, después 5 minutos a 45°C.
6. Las muestras se incubaron en el termociclador bajo las condiciones para el cocktail de hibridación (Tabla de programas en termociclador, en anexos).
7. Después de la incubación se centrifugó a spin y se inyectaron las muestras en el microarreglo.
 - Antes de inyectar la muestra, se colocó una puntilla en el septo derecho superior para permitir el flujo de la muestra (Figura 9).
8. Se inyectaron 200µl de la muestra en el microarreglo a través del septo libre (Figura 9).

9. Se retiró la puntilla del septo derecho superior, después de inyectada la muestra y se colocó un “1/2” Tough-Spots” para evitar evaporación.
10. Se colocó el microarreglo en la estufa de hibridación por 16 horas a 45°C con una rotación de 60rpm.

Lavado del microarreglo.

1. Se removieron los microarreglos de la estufa de hibridación, así como los Tough-Spots.
2. Se extrajo el cocktail de hibridación de los microarreglos, a través del septo de inyección.
3. Se llenó cada microarreglo con buffer de lavado A.
4. Se dejó que el microarreglo se atemperara.
5. Se colocó:
 - 1 tubo con 600µl del cocktail de teñido 1, en el porta muestra 1.
 - 1 tubo con 600µl del cocktail de teñido 2, en el porta muestra 2.
 - 1 tubo con 800µl del “Array Holding Buffer”, en el porta muestra 3.
6. Se lavó el microarreglo de acuerdo al protocolo FS450_0001 de la estación de lavado.
7. Después del lavado, se procedió con el escaneo del microarreglo.

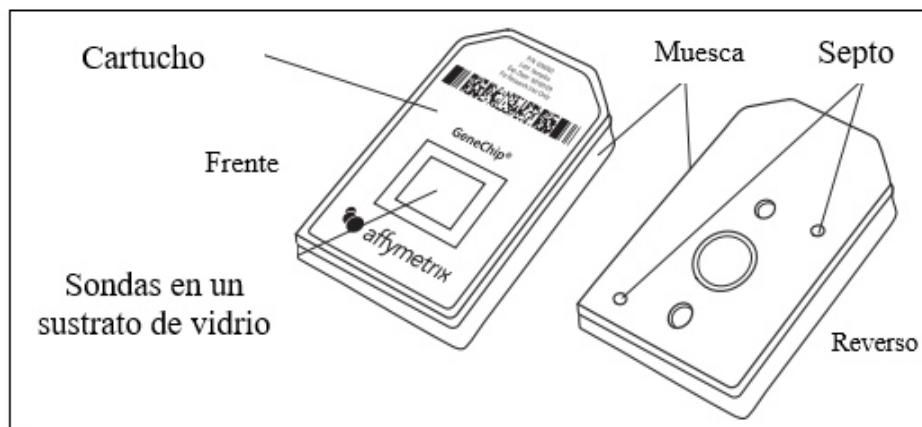


Figura 9. Ilustración de la conformación del chip de expresión: GENECHIP® RAT TRANSCRIPTOME PICO ASSAY 1, Affymetrix.

d) Caracterización del perfil de expresión génica del núcleo accumbens en la descendencia de ratas Wistar con/sin exposición a dieta hipercalórica y firma genómica de genes candidatos implicados en la adicción a la comida.

1. Se realizó una evaluación de los parámetros de control de los microarreglos (RMA y señal de expresión relativa) para determinar su viabilidad y comparabilidad.
2. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos del microarreglo de expresión global y se obtuvieron los genes diferencialmente expresados entre el total de microarreglos analizados.
3. Se generaron 3 comparaciones principales para evaluar:
 - 1ra evaluación del factor comportamiento, sobre la expresión génica de los sujetos de estudio (adictos vs no adictos)
 - 2da evaluación del factor dieta materna, sobre la expresión génica de su descendencia (F1 adictos de madres expuestas a dieta de cafetería vs F1 adictos de madres expuestas a dieta control).
 - 3ra evaluación del factor comportamiento y programación fetal materna sobre la expresión génica de su descendencia (F1 de madres adictas vs F1 de madres no adictas).
4. Se seleccionaron los genes diferencialmente expresados (sub- y sobre- expresados) del análisis de datos del microarreglo para cada comparación.
5. Se realizó un análisis bioinformático para determinar la función y relevancia biológica de los genes seleccionados.
 - Se utilizó la plataforma GeneCards, para saber la función biológica de los genes de interés.
 - Se hizo un análisis de interacción de los genes de interés mediante la plataforma STRING.
 - Se realizó una búsqueda de las vías de señalización en la que participan los genes seleccionados, empleando la base de datos KEGG pathway y Panther.
6. Se seleccionaron aquellos genes cuya función e interacción con otros genes, tuvieran participación en vías de señalización de interés y/o pudieran explicar el comportamiento observado en los grupos experimentales.

e) Integración de datos de microarreglos y comportamiento operante.

1. Se realizó una correlación descriptiva entre los genes de la firma genómica y el comportamiento observado de cada uno de los grupos experimentales, de la F1.

f) Análisis estadístico.

Con el fin de evaluar el comportamiento operante durante los protocolos de entrenamiento (FR1, FR5, PR), se realizaron pruebas de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Bonferroni. Tomando como valores significativos una $p < 0.05$.

Para determinar la cantidad de individuos pertenecientes a cada clasificación dependiente del comportamiento (adictos o no adictos), se generaron gráficas de pastel para obtener el porcentaje y se evaluó su significancia mediante una prueba de χ^2 .

Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía (no pareada) para determinar la significancia de la diferencia de expresión génica en las distintas comparaciones generadas. Tomando como punto de corte significativo un fold change de 1.7, y una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

i. Condicionamiento operante hacia la comida hipercalórica.

Para evaluar el comportamiento motivante (compulsivo-similar al adictivo), cada uno de los grupos experimentales de ratas Wistar, fueron sometidos al protocolo de condicionamiento empleando los esquemas FR1 y FR5, y PR. El protocolo FR1, se emplea para incentivar a los animales a asociar la liberación de la recompensa con los estímulos de sonido y luz, para establecer una respuesta condicionada más sólida. Durante el protocolo FR5 se condiciona aún más la respuesta de reforzamiento con base al incremento en el número de estimulaciones en la palanca con la finalidad de obtener la recompensa. Finalmente, el protocolo PR nos confirma el estado motivacional y operante del sujeto, mostrándonos el índice de comportamiento compulsivo para la obtención de la recompensa, con base en el aumento sucesivo de estimulaciones (para detalles ver métodos). Empleando este protocolo es posible clasificar a los animales con comportamiento similar al adictivo (adictos) o animales con ausencia de comportamiento motivante (no adictos).

Se clasificaron como adictos a aquellos que presionaron la palanca más de 10 veces en los protocolos FR1 y FR5, y más de 5 veces en el protocolo PR. Todos los sujetos que no compartían este criterio de inclusión se consideraron como no adictos.

a) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos y hembras (F0), expuestas a dieta control.

No existe diferencia significativa respecto al comportamiento motivante entre machos y hembras con un comportamiento motivante elevado (adictos), pero si entre los individuos adictos y no adictos de ambos sexos (Figura 10).

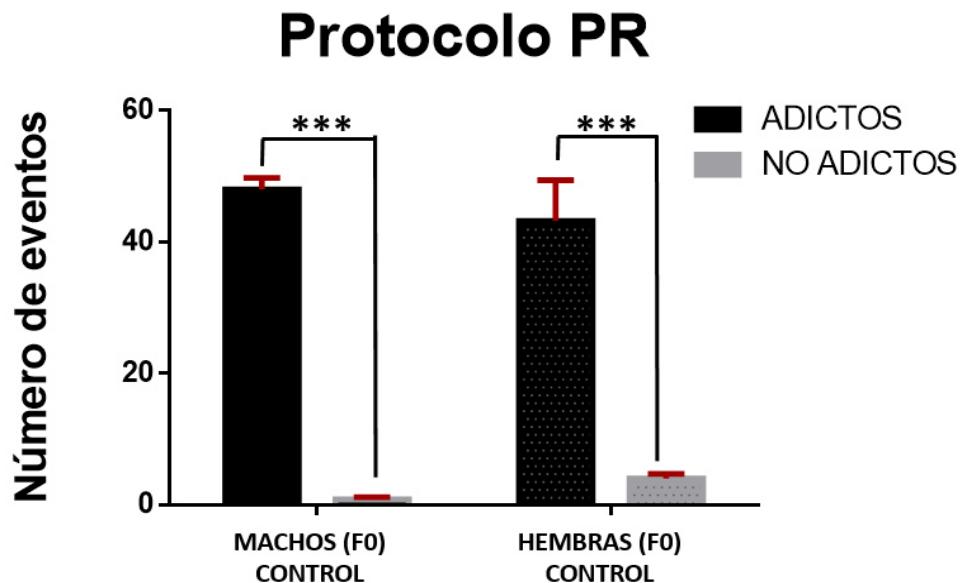


Figura 10. Comportamiento operante hacia la comida hipercalórica entre machos y hembras (F0). Comparación de la respuesta motivante entre machos y hembras padres - adictas y no adictas -, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni con ***p< 0.005).

En el grupo de las hembras F0 que fueron expuestas a dieta control, la cantidad de hembras adictas, es muy similar a la cantidad de hembras no adictas, por lo que no existe diferencia significativa en cuanto a la clasificación de las mismas (Figura 11).

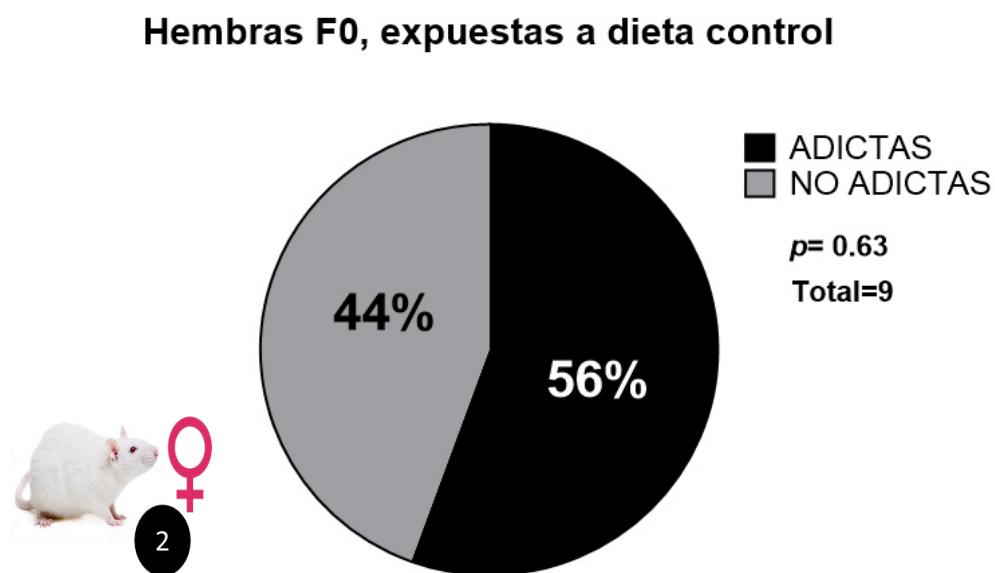


Figura 11. Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (madres) adictas y no adictas, expuestas a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=9; Chi² con p< 0.05).

Machos F0, expuestos a dieta control

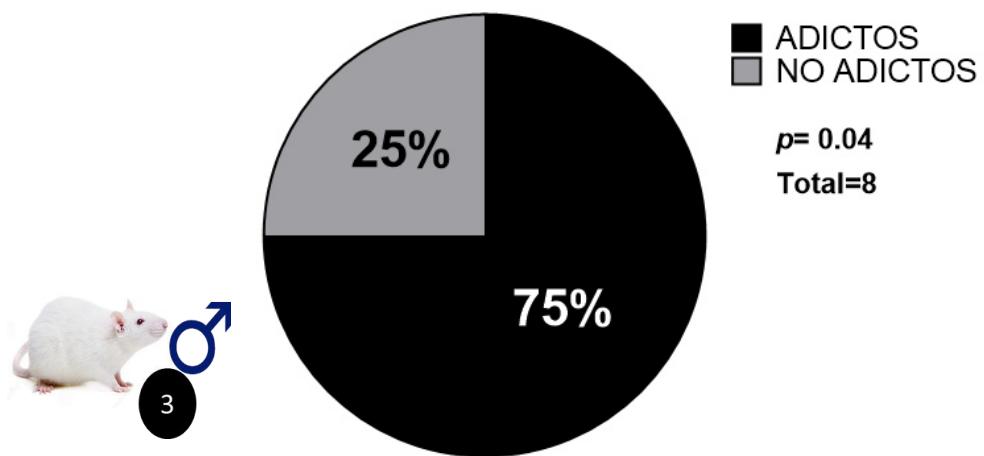


Figura 12. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F0 (padres) adictos y no adictos, expuestas a dieta control; Clasificados con base al número de eventos en el protocolo PR durante 5 días. (n=8; Chi² con p< 0.05; *p= 0.04)

Los resultados muestran que el grupo de machos F0 expuestos a dieta control presentaron un mayor número de sujetos con un comportamiento motivante elevado durante la prueba de condicionamiento progresivo (PR), haciendo evidente la diferencia entre sujetos adictos y no adictos (Figura 12).

b) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de la descendencia (F1) de machos expuestos a dieta control.

Del grupo de machos F0, se seleccionó a dos machos con el mayor comportamiento motivante (adictos) y dos machos con el menor comportamiento motivante (no adictos), con base en los resultados del protocolo PR. A cada uno de estos sujetos se les cruzó con hembras control para mantener la influencia de la transmisión del fenotipo a la descendencia F1 por vía paterna.



En la figura 13 y 14, se puede observar que los machos F1 adictos muestran mayor número de eventos en el protocolo FR1 y FR5, respecto a los machos no adictos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el comportamiento motivante al comparar ambos grupos de padres.

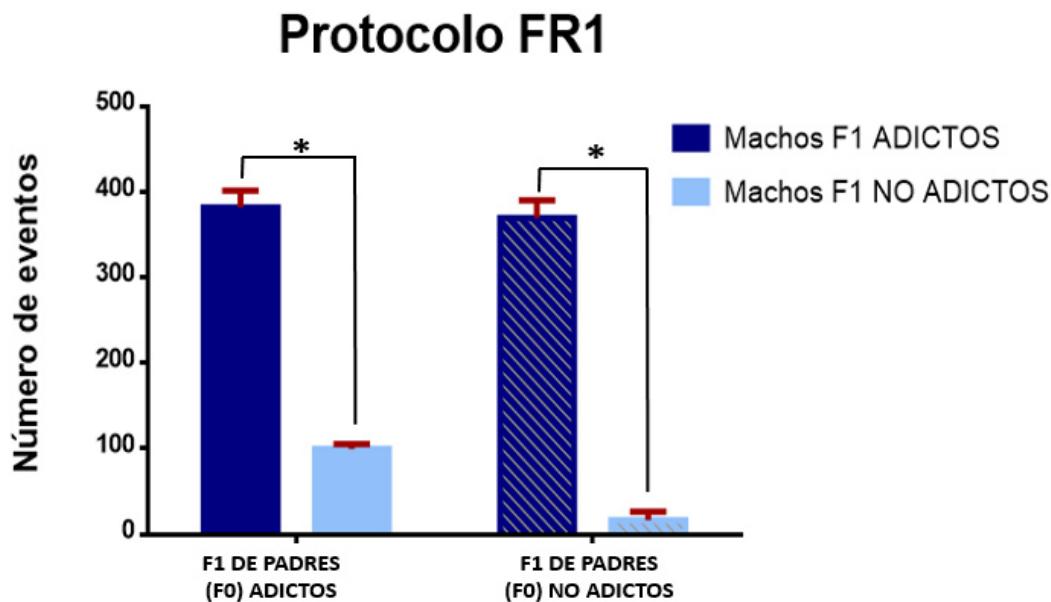


Figura 13. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales de los tres días del protocolo FR1. Barras azules: machos F1 clasificados como adictos; barras celestes: machos F1 clasificados como no adictos. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; *p< 0.05)

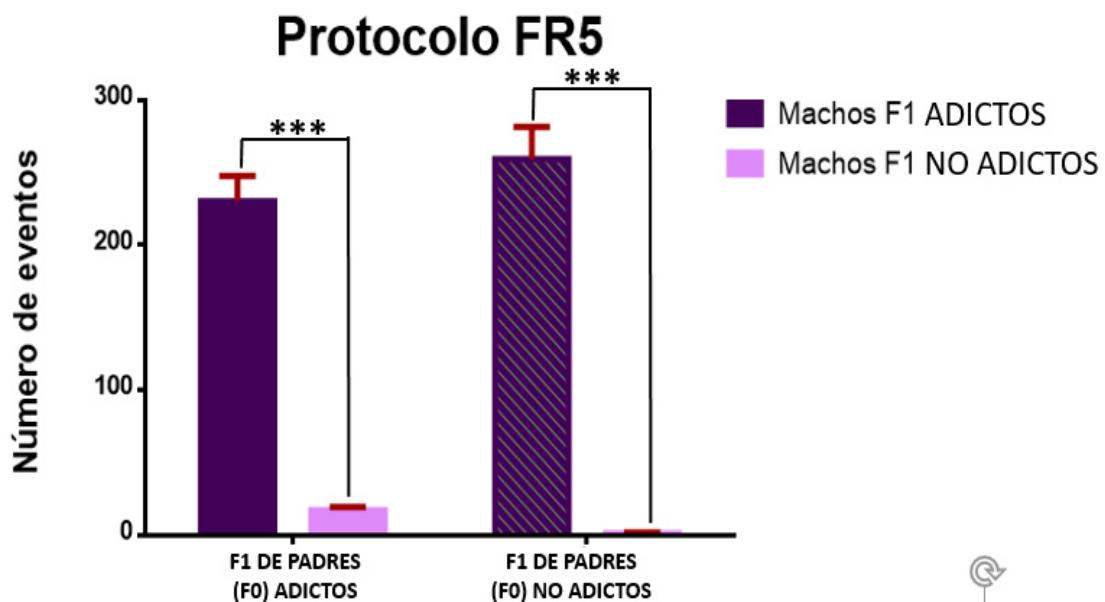


Figura 14. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales de los cuatro días del protocolo FR5. Barras moradas: machos F1 clasificados como adictos; Barras lilas: machos F1 clasificados como no adictos. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; ***p< 0.005)

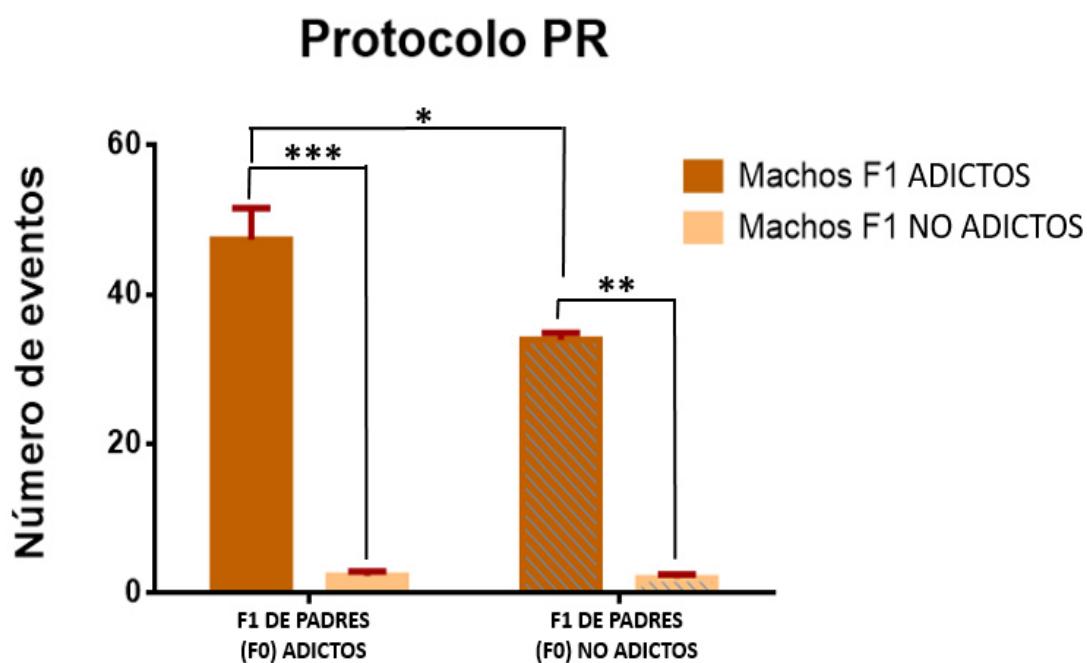


Figura 15. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR. Barras anaranjado oscuro: machos F1 clasificados como adictos; Barras anaranjado claro: machos F1 clasificados como no adictos. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; ***p< 0.005)

De manera similar a los protocolos FR1 y FR5, se evaluó el condicionamiento motivante de los machos F1 adictos y no adictos empleando el protocolo PR. Nuestros datos muestran que la descendencia de padres adictos presenta una mayor motivación para obtener la recompensa respecto a la descendencia de padres no adictos (Figura 15). Este mismo comportamiento puede verse reflejado durante los cinco días del protocolo PR (Figura 16).

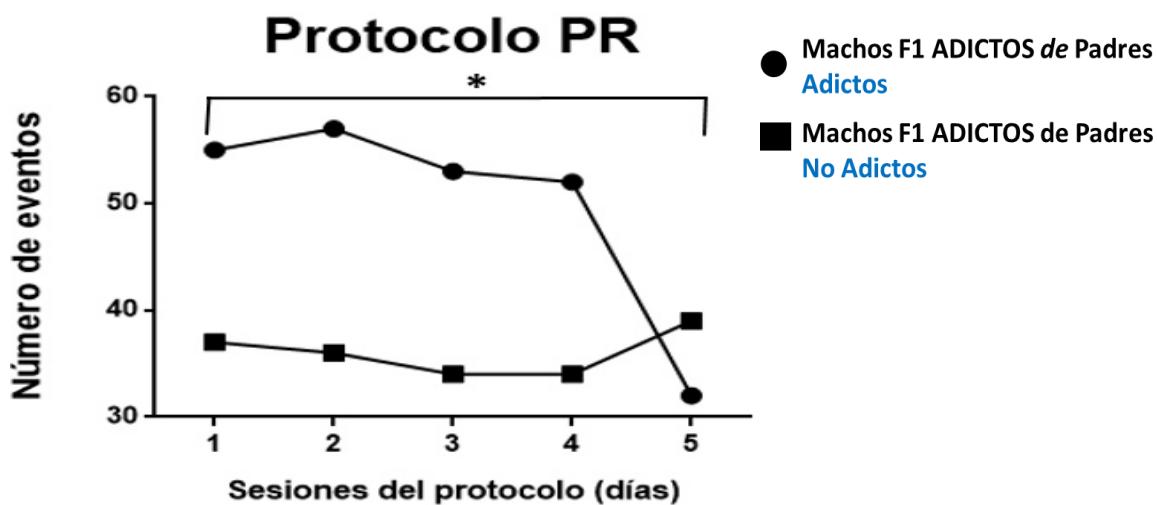


Figura 16. Gráfica de puntos del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de machos (adictos y no adictos), expuestos a dieta control; número de eventos totales durante los cinco días del protocolo PR. Línea con círculos: promedio del comportamiento de los machos F1-adictos descendientes de padres con la misma clasificación; Línea con cuadrados: promedio del comportamiento de los machos F1-adictos provenientes de padres no adictos (n=8; n=6; ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; *p< 0.05,.)

Posterior al análisis comparativo del comportamiento motivante entre machos F1 de ambos grupos de padres, se realizó una comparación entre la cantidad de animales de cada clasificación (adictos y no adictos). Los resultados en la imagen muestran que existe significativamente un 75% de sujetos con conducta semejante a la adicción provenientes de padres adictos, respecto a un 25% de machos no adictos (Figura 17). Estos datos nos indican que existen 3 veces más número de descendientes adictos provenientes de padres machos adictos que la descendencia de padres no adictos.

De interés, no existen diferencias significativas entre el porcentaje de machos con motivación para reforzamiento progresivo en la descendencia de machos sin adicción a la comida (67% vs 33%) (Figura 18).

Machos F1, descendientes de machos F0- adictos

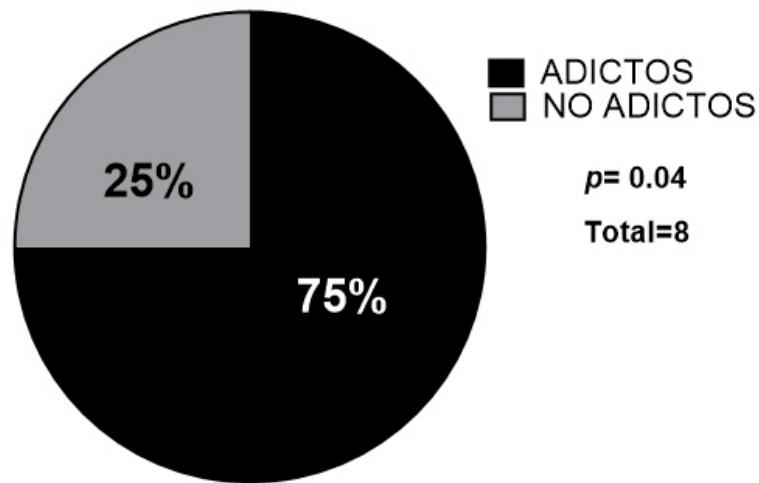


Figura 17. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de padres adictos, expuestos a dieta control; Clasificados con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=8; Chi² con p< 0.05; *p= 0.04)

Machos F1, descendientes de machos F0- no adictos

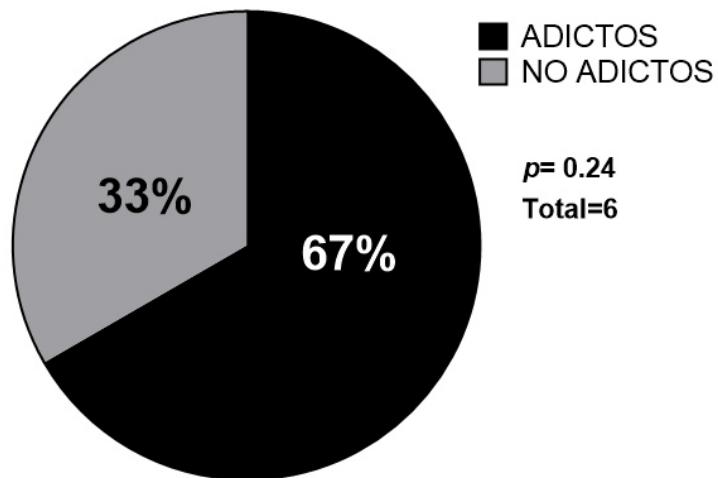


Figura 18. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de padres no adictos, expuestos a dieta control; Clasificados con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=6; Chi² con p< 0.05; p=0.24)

c) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de madres hembras F0, expuestas o no a dieta de cafetería.

Como se puede observar en la figura 19, las hembras F0 que fueron expuestas a dieta de cafetería durante 9 semanas, no muestran una diferencia significativa entre el número de hembras adictas y no adictas. Solo se puede observar una tendencia ligeramente mayor a presentar un fenotipo no adicto. Estos resultados son antagónicos a los presentados por el grupo de hembras F0, expuestas a dieta control (Figura 20).

Hembras F0, expuestas a dieta de cafetería

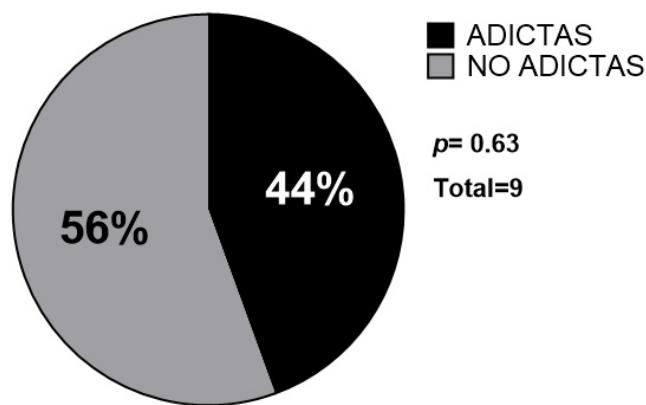


Figura 19. Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (adictas y no adictas), expuestas a dieta de cafetería; Clasificadas con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=9; Chi² con p< 0.05; p=0.63)

Hembras F0, expuestas a dieta control

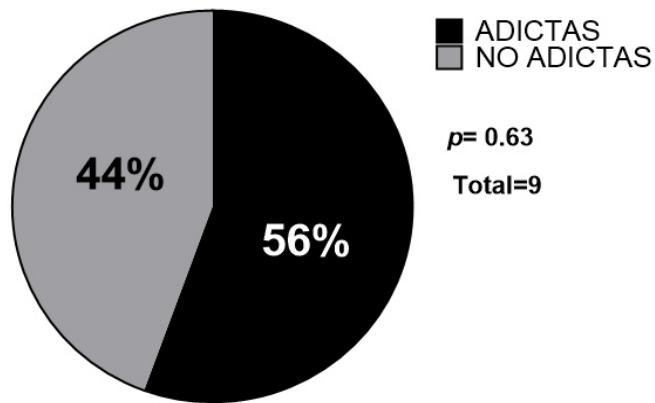


Figura 20. Gráfica de pastel de los porcentajes de hembras F0 (adictas y no adictas), expuestos a dieta control; Clasificadas con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=9; Chi² con p< 0.05; p=0.63)

d) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos F1, descendientes de hembras F0, expuestas a dieta control.

El comportamiento motivante entre los descendientes (F1) de madres adictas y su contraparte, expuestas a dieta control, es similar. Sin embargo, en la Figura 21, se puede observar una diferencia significativa entre la motivación de los descendientes adictos y los no adictos de ambos grupos.

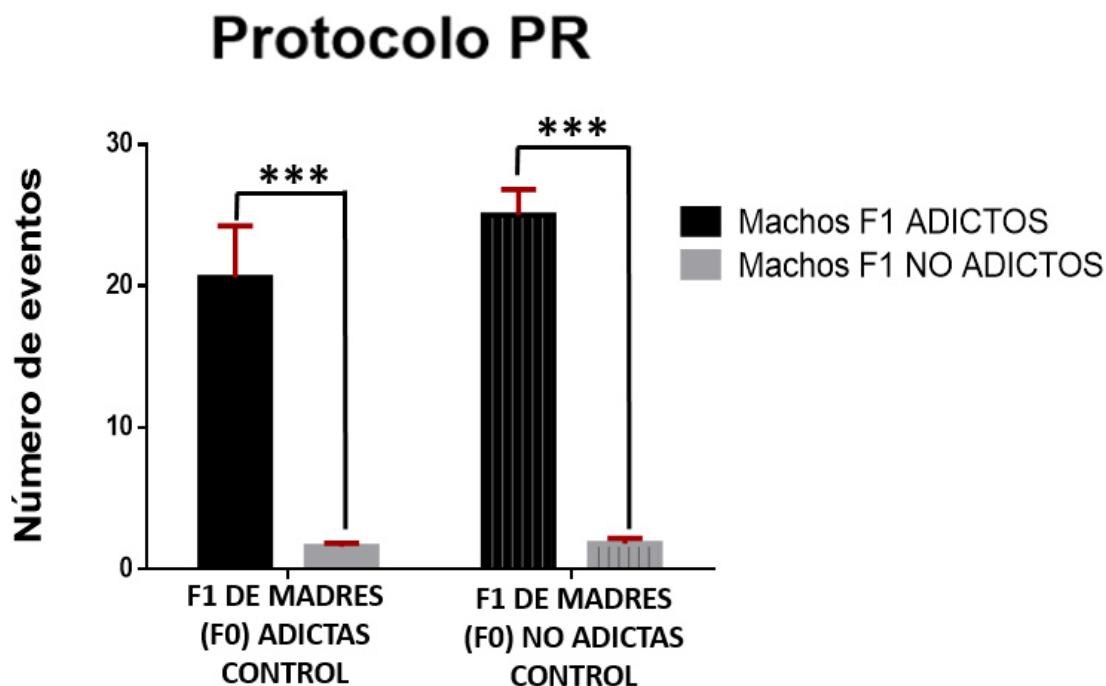


Figura 21. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta control; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR. Barras negras: machos F1 clasificados como adictos; Barras grises: machos F1 clasificados como no adictos. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; ***p<0.005)

Los machos F1 provenientes de madres-adictas, expuestas a dieta control, muestran un mayor comportamiento adictivo, habiendo 4 veces más machos F1 adictos, con respecto a los machos F1 no adictos (Figura 22).

Machos F1, descendientes de hembras F0- adictas, expuestas a dieta control

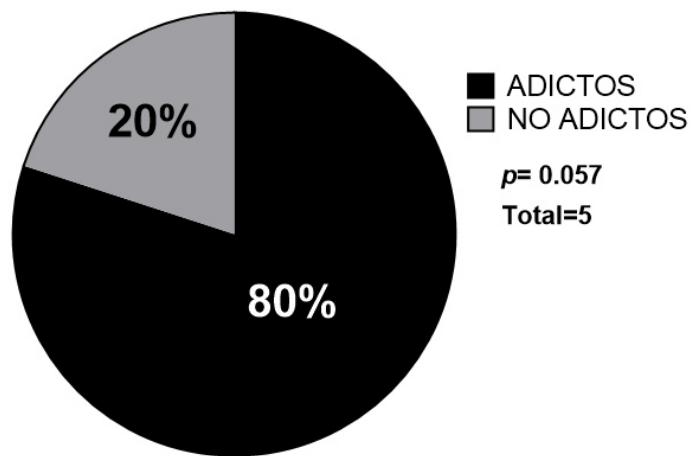


Figura 22. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres adictas, expuestas a dieta control; Clasificados con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=5; Chi² con p< 0.05; p=0.057)

Machos F1, descendientes de hembras F0- no adictas, expuestas a dieta control

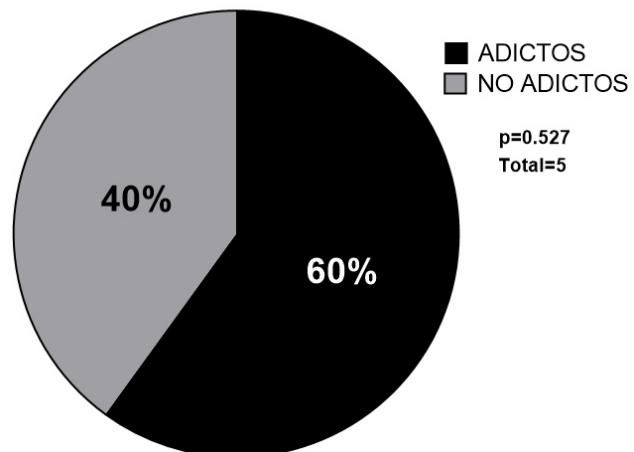


Figura 23. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres no adictas, expuestas a dieta control; Clasificados con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=8; Chi² con p< 0.05; p=0.31)

En el caso de los machos F1, descendientes de madres no adictas, expuestas a dieta control, no existen diferencias significativas entre los machos F1 adictos, con respecto a su contraparte (no adictos) (Figura 23).

- e) Condicionamiento operante hacia la dieta hipercalórica de machos F1, descendientes de hembras F0, expuestas a dieta de cafetería.

En la Figura 24, se puede observar que la descendencia de madres adictas presenta una mayor motivación para obtener la recompensa respecto a la descendencia de madres no adictas, lo cual puede verse reflejado a lo largo de los cinco días del protocolo PR (Figura 25).

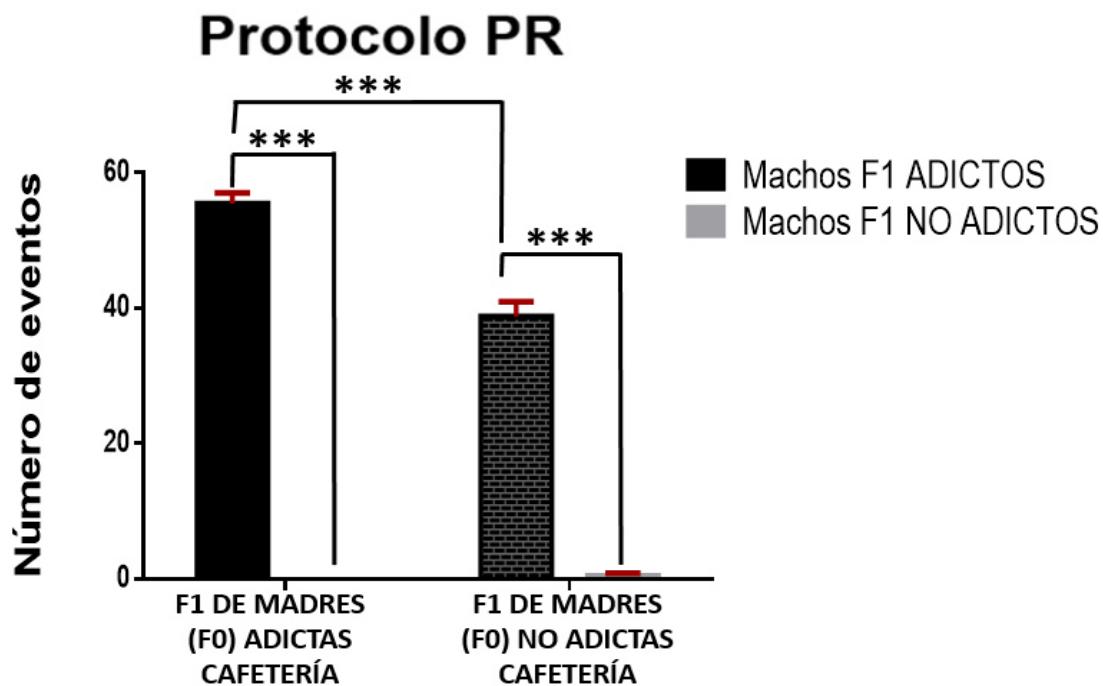


Figura 24. Gráfica de barras del comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta cafeteria; número de eventos totales de los cinco días del protocolo PR. Barras negras: machos F1 clasificados como adictos; Barras grises: machos F1 clasificados como no adictos. (ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; ***p<0.005)

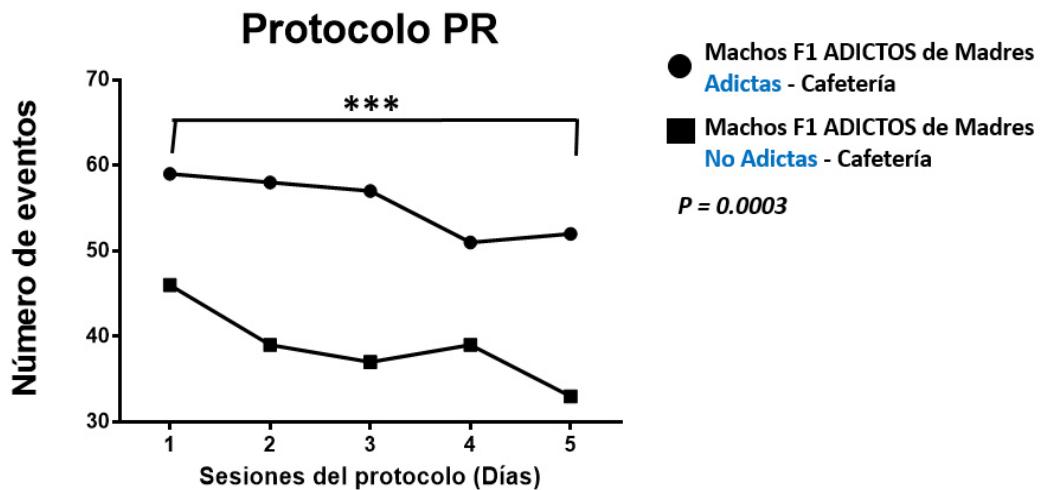


Figura 25. Comportamiento operante hacia la dieta hipercalórica entre machos descendientes (F1) de hembras (adictas y no adictas), expuestas a dieta cafetería; número de eventos totales durante los cinco días del protocolo PR. Línea con círculos: promedio del comportamiento de los machos F1-adictos descendientes de madres con la misma clasificación; Línea con cuadrados: promedio del comportamiento de los machos F1-adictos provenientes de madres no adictas (n=7, n=8; ANOVA de dos vías; Post-hoc Bonferroni; ***p< 0.005,.)

Como se puede observar en la Figura 26, las madres adictas, expuestas a reprogramación fetal por la ingesta de dieta de cafetería, tienden a tener mayor cantidad de descendientes que muestran el mismo fenotipo. Siendo 6 veces más la cantidad de machos F1 adictos, en comparación con los que no lo son.

Machos F1, descendientes de hembras F0- adictas, expuestas a dieta cafetería

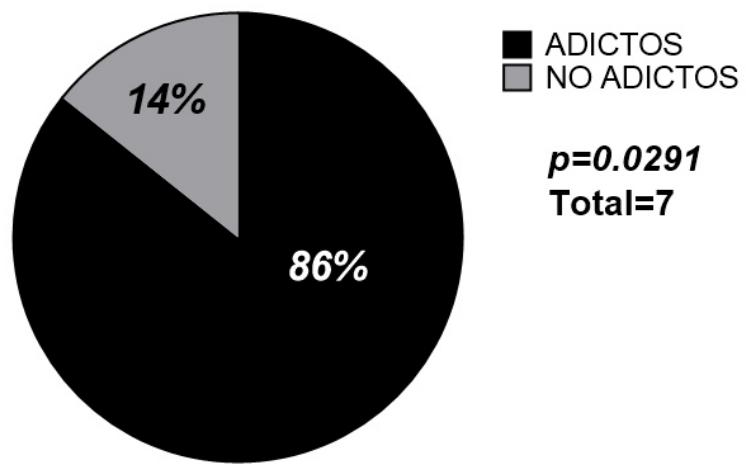


Figura 26. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres adictas, expuestas a dieta de cafetería; Clasificados con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=7; Chi² con p< 0.05; *p=0.029)

En contraste, la descendencia de madres no adictas y expuestas a dieta de cafetería, se observa el mismo resultado que para el grupo de descendientes de madres expuestas a dieta control. Solo hay 1.6 veces más machos F1 clasificados como adictos, en comparación con los que no son adictos (Figura 27).

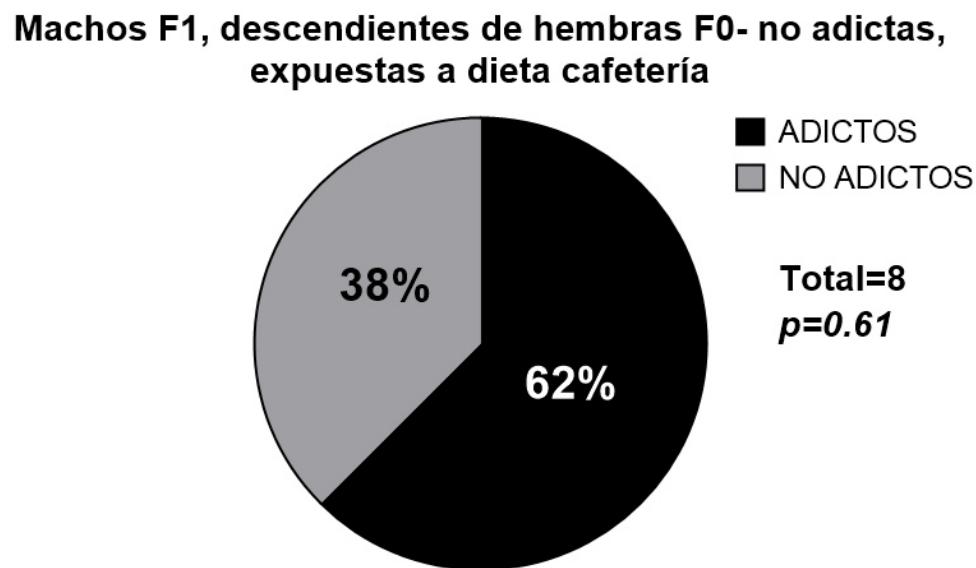


Figura 27. Gráfica de pastel de los porcentajes de machos F1 (adictos y no adictos) provenientes de madres no adictas, expuestas a dieta de cafetería; Clasificados con base al número de eventos durante 5 días del protocolo PR. (n=7; Chi² con p< 0.05; p=0.061)

ii. Caracterización del perfil de expresión génica del núcleo accumbens en la descendencia de madres con/sin exposición a dieta hipercalórica.

Las métricas de los microarreglos muestran la correcta manipulación de los chips durante el proceso, lo cual se puede observar en la Figura 28. Se observa que la intensidad de la señal relativa de cada uno de los microarreglos es constante en todo el grupo de muestras analizadas, de acuerdo a la normalización de los datos por RMA.

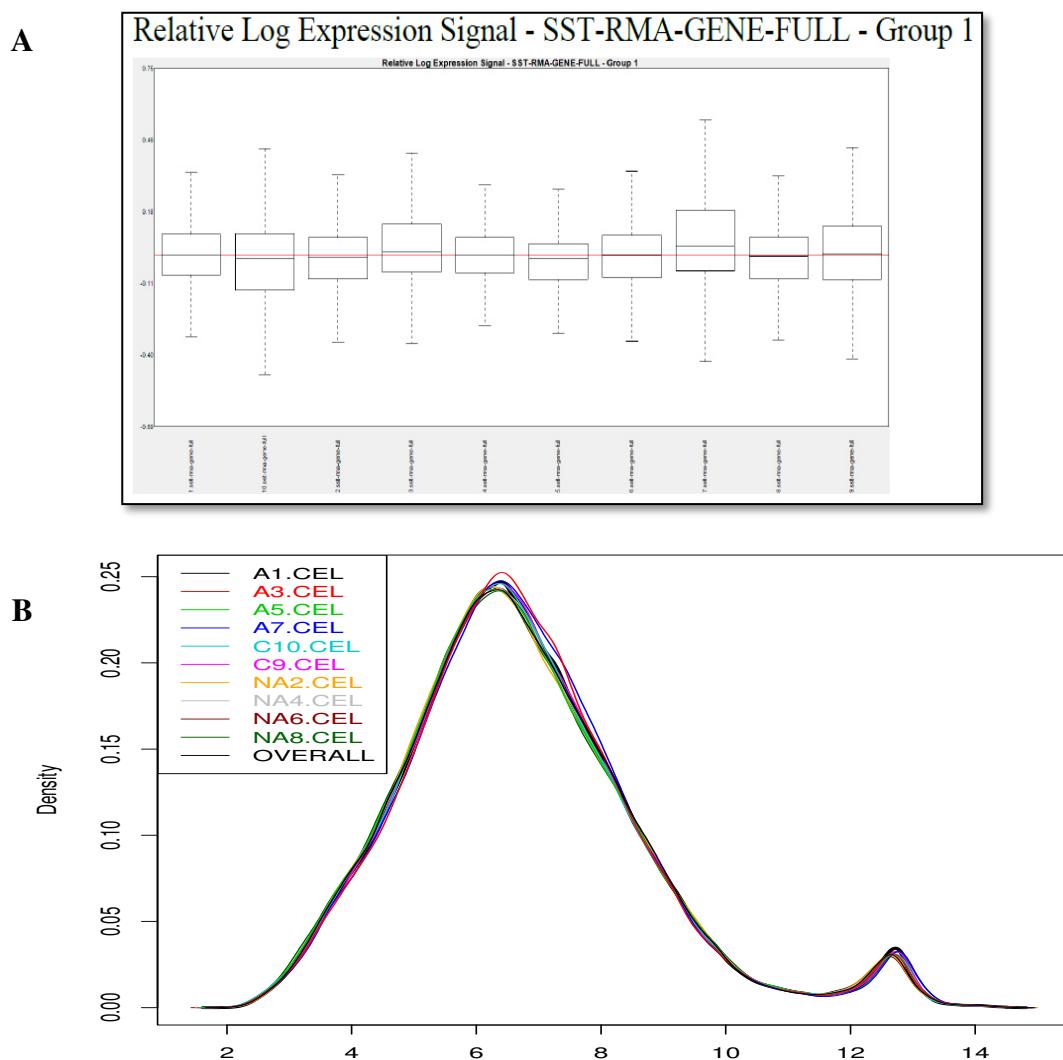


Figura 28. Métricas de control y normalización de los microarreglos.

- A) Normalización de la señal de expresión relativa de los microarreglos.
- B) Normalización de la densidad de señal de los microarreglos.

a) Análisis de expresión génica diferencial entre los grupos.

De acuerdo al análisis de comparación entre grupos, se obtuvieron un total de 17,645 genes diferencialmente expresados. De este total se encontraron 769 genes diferencialmente expresados con una $p<0.05$, entre los sujetos adictos y no adictos (factor comportamiento). Mientras que al realizar una comparación entre la descendencia (F1) de madres adictas contra los hijos de madres no adictas (factor comportamiento materno), se encontraron 589 genes diferencialmente expresados con una $p<0.05$. Por otra parte, se obtuvieron 2045 genes diferencialmente expresados con una $p<0.05$, entre los hijos de madres adictas expuestas a dieta de cafetería y aquellos descendientes adictos de madres expuestas a dieta control (factor dieta materna). Dichos genes diferencialmente expresados muestran un rango de expresión (fold change) entre -1/+1 a -4/+4 (Figura 29).

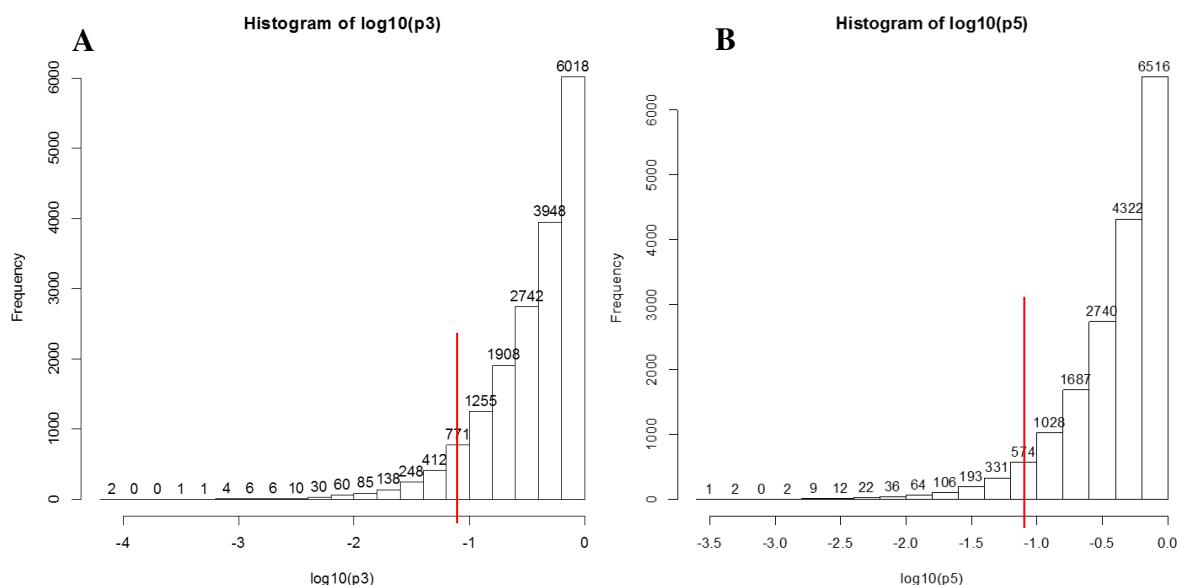


Figura 29. Evaluación de los factores: comportamiento, dieta y programación fetal materna, sobre la expresión génica de la descendencia (F1). A) Cantidad de genes y rango de expresión diferencial entre machos F1 adictos y no adictos. B) Cantidad de genes y rango de expresión diferencial entre F1 adictos de madres con dieta de cafetería y F1 adictos de madres con dieta control.

b) Comparación del perfil de expresión de la firma de genes relacionados con adicción a drogas, con la expresión génica en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.

Se seleccionó de manera intencionada a los genes relacionados con el desarrollo de adicción a drogas (Tabla 14), los cuales se encontraron diferencialmente expresados, con un rango de expresión (fold change) entre -1.01/+1.01 y -1.25/+1.25, en la descendencia F1(adictos vs no adictos) de madres con y sin exposición a dieta hipercalórica (Tabla 15). Esto nos indica, la correlación del perfil de expresión de los genes selectivos de adicción a drogas con el perfil de nuestro modelo de adicción a la comida.

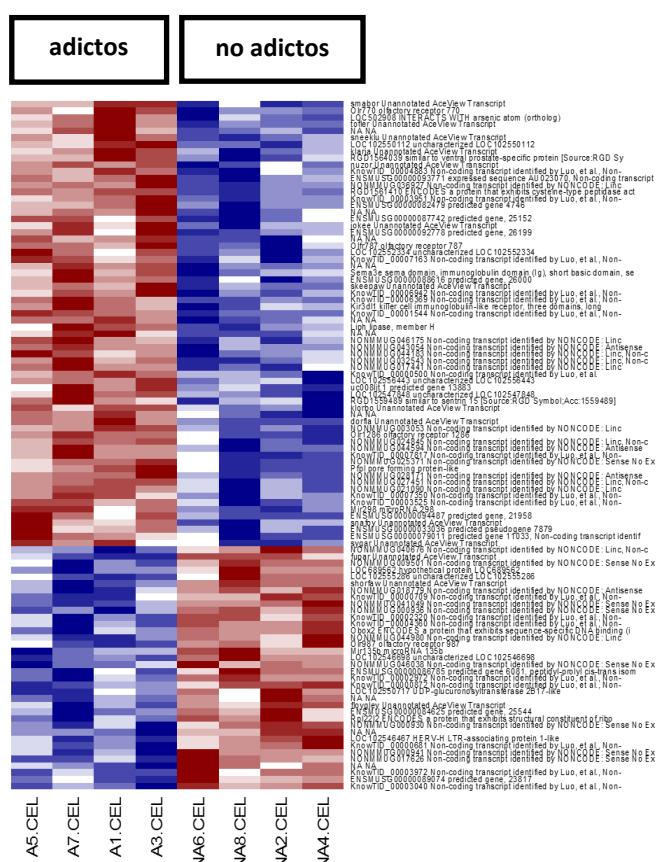
Tabla 14. Genes alterados en diferentes áreas del cerebro relacionadas con adicción a drogas.	
NF-κB	
ΔFosB	
CREB	
BDNF	
MEF2	
DR1	
DR2	
NFAT5	
ELF1	
PPP1R9A	
NRG1	
SEMA6D	
MECP2	
SIRT	
HDACs	
Cdk5	

Tabla 15. Perfil de expresión en el modelo de adicción a la comida hipercalórica.	
Gen	Fold change
BDNF	1.09
CREB	1.08
FOSB	1.09
MECP2	1.04
MEF2	-1.07
SIRT1	1.1
LIMK2	1.04
DR2	-1.25
DR1	-1.02
ELF1	1.06
NFAT5	-1.02
PPP1R9A	-1.12
SEMA6D	1.24
HDAC1	-1.05
HDAC2	1.09
HDAC4	-1.03
Cdk5	-1.1
Dlg4	-1.17
Gpsm1	1.01
Gria2-GluA2	-1.14
Gria3-GluA3	-1.22
Gria1-GluA1	-1.16
Gria4-GluA4	1.1

c) Evaluación del factor comportamiento en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens en la descendencia (F1) de madres con/sin dieta hipercalórica.

Al comparar la descendencia de machos con conducta semejante a la adicción, encontramos que, en la F1 de adictos vs no adictos, se observan 27 genes diferencialmente expresados con significancia estadística, de los cuales 3 genes se encontraron sub-expresados y 16 sobre-expresados, incluyendo el microRNA, Mir298 (Figura 30). Los 8 genes restantes fueron transcritos no codificantes o no estaban identificados, por lo cual no se encuentran en la lista.

A



B

Gen	Expresión en Adictos
<i>Gpr149</i>	↓
<i>Mir135b</i>	↓
<i>Rpl22l2</i>	↓
<i>Ndst4</i>	↑
<i>Chrm3</i>	↑
<i>Syt17</i>	↑
<i>Abi3bp</i>	↑
<i>Car10(CA10)</i>	↑
<i>Stx1a</i>	↑
<i>Nppa</i>	↑
<i>Mir298</i>	↑
<i>Pfpl (MPEG)</i>	↑
<i>Kir3dl1</i>	↑
<i>Sema3e</i>	↑
<i>Liph</i>	↑
<i>Klra5</i>	↑
<i>Olfr787</i>	↑
<i>Olr770</i>	↑
<i>Olr1286</i>	↑

Figura 30. Genes diferencialmente expresados en el núcleo accumbens de machos (F1) adictos y no adictos, tomando en cuenta el factor comportamiento. A) Mapa de calor del total de genes alterados entre adictos y no adictos. B) Lista de genes codificantes alterados en sujetos adictos con respecto a su contraparte (no adictos) fold change -1.7/+1.7; ANOVA de una vía; p<0.05

d) Evaluación del factor dieta materna en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens de su descendencia (F1).

La comparación entre machos F1 adictos, tomando en cuenta el factor dieta materna, generó una expresión diferencial significativa de 20 genes en los sujetos adictos de madres expuestas a dieta de cafetería durante el embarazo y lactancia. De estos, 13 transcritos eran no codificantes o no estaban identificados. De los 7 restantes, se encontraron 6 genes sobre-expresados, incluyendo 2 microRNAs y 1 solo gen sub-expresado (Figura 31).

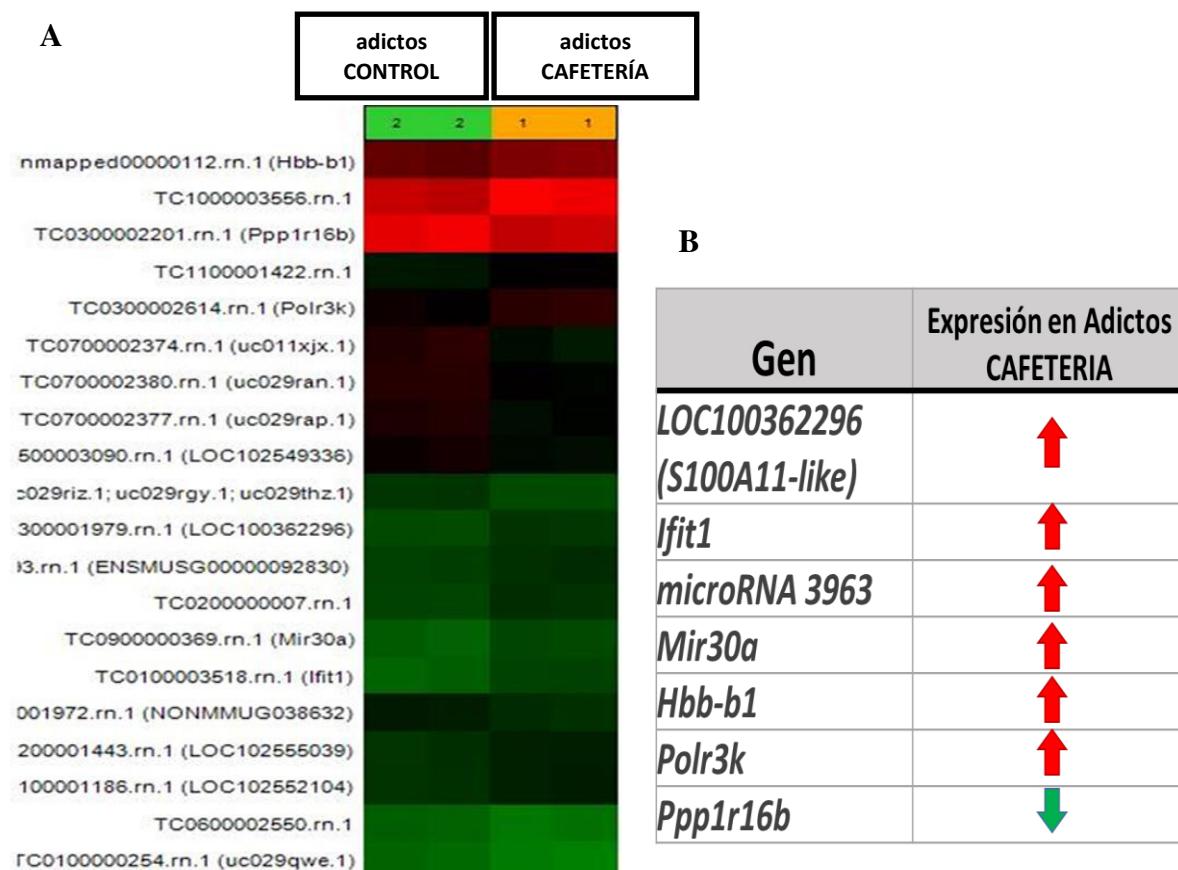


Figura 31. Genes diferencialmente expresados en el núcleo accumbens de machos (F1) adictos provenientes de madres con/sin exposición previa a dieta hipercalórica. A) Mapa de calor del total de genes alterados entre sujetos adictos provenientes de madres con o sin dieta de cafetería. B) Lista de genes codificantes alterados en los hijos adictos de madres expuestas a dieta de cafetería con respecto a su contraparte (adictos de madres control) fold change -1.7/+1.7; ANOVA de una vía; p<0.05

e) Evaluación del factor comportamiento materno en el perfil de expresión génica del núcleo accumbens de la descendencia (F1) proveniente de madres con/sin dieta hipercalórica.

La influencia del comportamiento materno sobre su descendencia, generó la alteración diferencial significativa de 37 genes, de los cuales sólo 4 estaban identificados y regulados a la alta en los hijos de madres adictas. Mientras que los 33 restantes, eran transcritos no codificantes o no estaban identificados (Figura 32).

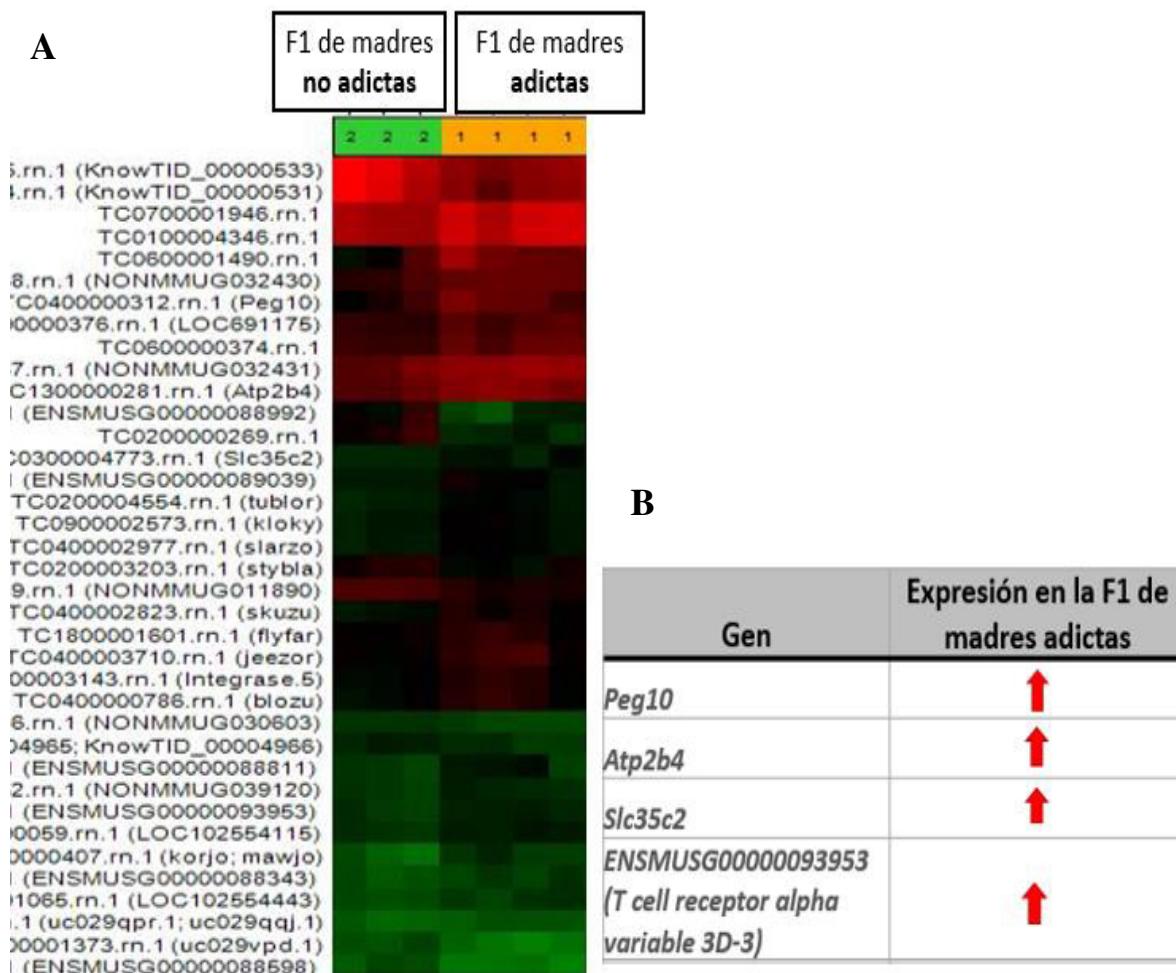


Figura 32. Genes diferencialmente expresados en el núcleo accumbens de machos (F1) provenientes de madres adictas y no adictas. A) Mapa de calor del total de genes alterados entre descendientes de madres con/sin comportamiento adictivo. B) Lista de genes codificantes alterados en los hijos de madres adictas. Fold change -1.7/+1.7; ANOVA de una vía; p<0.05

f) Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en la descendencia (F1) de madres con exposición previa o no a una dieta hipercalórica

Se realizó una búsqueda de la función biológica, con base a la interacción y vías de señalización en las que participan cada uno de los genes significativamente alterados (sub o sobre-expresados). Empleando el programa Panther pathway, se encontró que la vía de señalización más enriquecida pertenece a la vía de los receptores de acetilcolina muscarínicos 1 y 3, con un 18.2% con respecto al total de genes analizados. Por otra parte, también se encontraron vías de señalización involucradas en el tráfico de vesículas sinápticas, señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G (Gi, Gs, Gq y Go) en neuronas, vías de señalización de receptores de glutamato y nicotínico-acetil colinérgicos, así como vías de señalización patológicas asociadas a Alzheimer. Todas con un porcentaje de 9.1% con respecto al total de genes analizados (Figura 33).

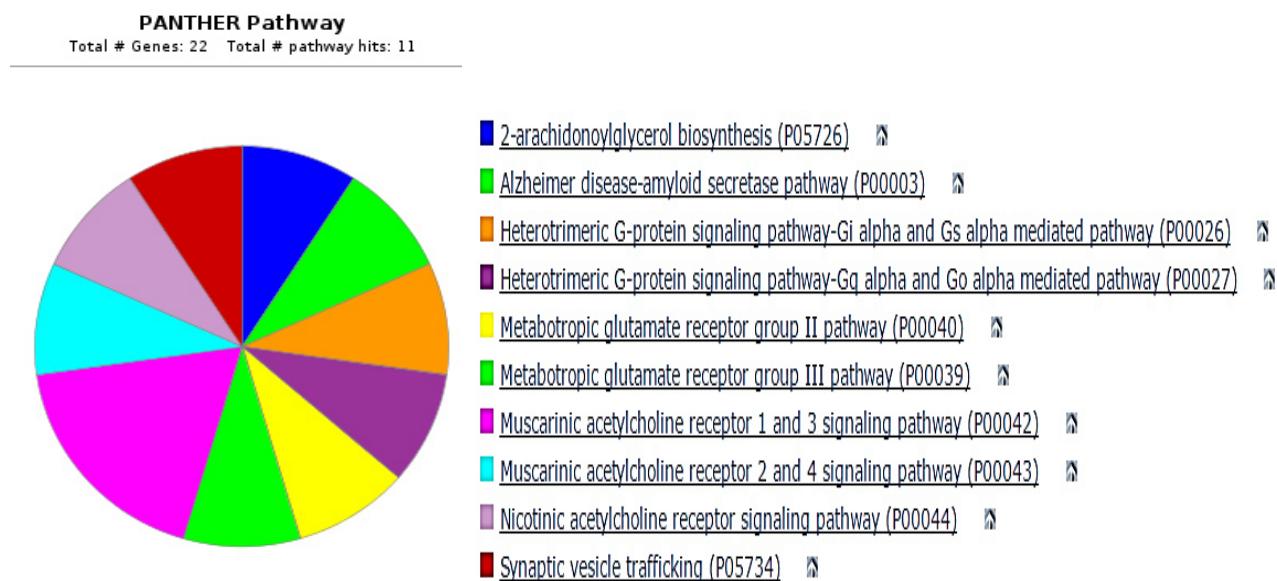


Figura 33. Principales vías de señalización de los genes diferencialmente expresados en los machos descendientes (F1) de madres con/ sin exposición previa a dieta hipercalórica. Total de genes analizados 22; 11 vías de señalización implicadas con base en los genes involucrados.

Posteriormente se identificó a las proteínas candidato con respecto a los genes analizados y se observó que la mayoría de los genes codifican para proteínas de señalización molecular (29.4%), seguido de proteínas asociadas a receptores (11.8%) e hidrolasas (11.8%). Sin embargo, también se encontraron proteínas de unión a calcio, transporte (calcio y iones), tráfico de proteínas en membrana, defensa e inmunidad, entre otras. Todas con un porcentaje de 5.9% respecto al total de genes analizados (Figura 34).

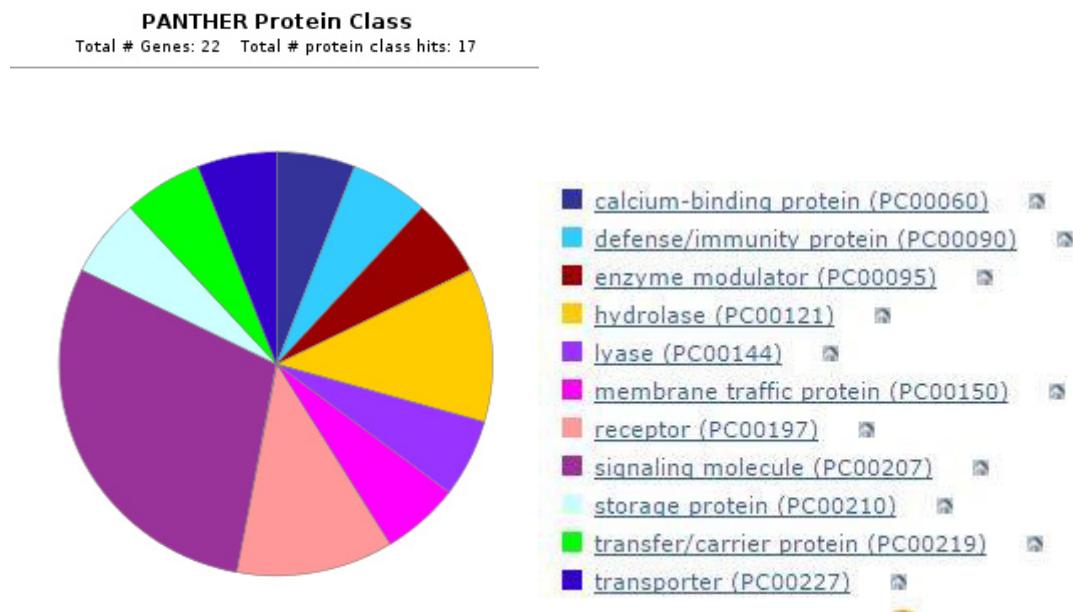


Figura 34. Clase de proteínas a la que pertenecen los genes diferencialmente expresados en los machos descendientes (F1) de madres con/ sin exposición previa a dieta hipercalórica. Total de genes analizados 22; 17 clases de proteínas a la que pertenecen los genes involucrados.

Finalmente, indagamos la función biológica de los genes y su interacción con otras proteínas. Los resultados obtenidos mediante la base de datos GeneCards, indican que la mayoría de los genes codifican para proteínas involucradas en procesos de señalización celular, proteínas de unión a receptores - acoplados a proteínas G, remodeladores del citoesqueleto, proteínas de respuesta inmune y proteínas de metabolismo de lípidos.

Con base en la función, se buscó la interacción de las proteínas codificadas por los genes con otras proteínas y las vías de señalización en las que están involucradas. Esto mediante la plataforma STRING y KEGG Pathways.

iii. Firma de genes candidatos implicados en el comportamiento de adicción a la comida

Con base en los análisis de funcionalidad, interacción y vías de señalización realizados, se seleccionaron 4 genes candidatos con potencial para explicar un fenotipo similar a la adicción, observado en nuestro modelo de adicción a la comida. Dichos genes presentan una fuerte participación en procesos de exocitosis de neurotransmisores, señalización y plasticidad sináptica (Syt17, Stx1a), así como también en procesos de respuesta inflamatoria (IFIT1) y desarrollo placentario y embrionario normal (Peg10). También se destacan por su asociación con daño cognitivo y demencia-Alzheimer (Xue-Yan, et al., 2016; Öhrfelt, et al., 2016), regulación del tráfico de receptores NMDA (Davanger, et al., 2016), reprogramación fetal por exposición materna a drogas (MDMA o éxtasis) (Eun, et al., 2010), y defectos en la placentación y el desarrollo embrionario, Tabla 16 (Jyotdeep, et al., 2017).

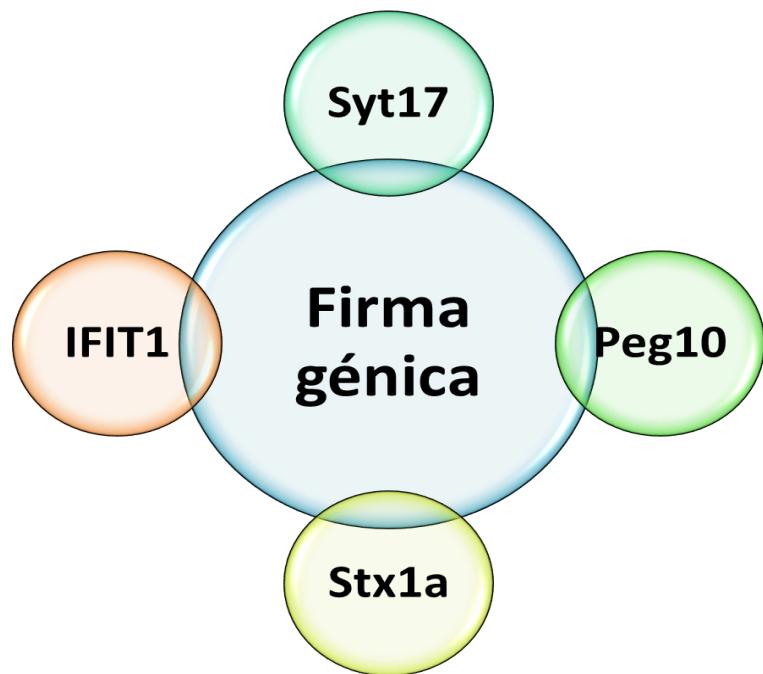


Figura 35. Firma de genes propuesto para comprender el comportamiento adictivo hacia la comida hipercalórica.

Tabla 16. Función e implicaciones de los genes de la firma génica propuesta en adicción a la comida hipercalórica

Gen	Función	Implicación	Referencia
Syt17 (Sinaptotagmina 17)	Regulador de la señalización sináptica: exocitosis vesicular de neurotransmisores.	*Asociada a daño cognitivo por reprogramación (ratones CD-1). *Asociado con la gravedad de la demencia y el Alzheimer (humanos).	Xue-Yan, et al., 2016. Öhrfelt, et al., 2016.
Stx1a (Sintaxina 1A)	Regulador de la señalización sináptica: acoplamiento de vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica.	Involucrada en la regulación del tráfico de receptores NMDA (ratas Wistar).	Davanger, et al., 2016.
IFIT1 (Proteína Inducida por Interferón con repeticiones tetratricopeptídicas 1)	Inductor de la respuesta inmune antiviral, vía interferón gama; sensor del RNA viral de cadena sencilla e inhibidor de la expresión del RNA mensajero.	*Sobreexpresado en neuronas posteriores a administración de cocaína (células progenitoras neuronales humanas). *Alterado en la descendencia de madres expuestas a la droga MDMA (éxtasis), durante el embarazo (ratones C57BL/6N).	Crawford, et al., 2006. Eun, et al., 2010.
Peg10 (Expresado Paternamente 10)	Importante en la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis.	Relacionado con el desarrollo normal de la placenta y/o Defecto en el desarrollo embrionario (humanos).	Jyotdeep, et al., 2017

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio demostramos que un modelo de condicionamiento operante hacia la comida altamente apetecible en ratas, es eficaz en inducir un comportamiento semejante a la adicción.

Empleando pellets de chocolate como recompensa natural al reforzamiento progresivo, el modelo nos permitió identificar dos grupos de ratas Wistar con comportamiento diferencial que se divide entre aquellas que muestran un alto comportamiento similar al adictivo y aquellos con bajo nivel de respuesta hacia la búsqueda de recompensas. Nuestros resultados correlacionan con aquellos publicados recientemente por Mancino y colaboradores en el 2015. Por otra parte, el reforzamiento progresivo hacia recompensas mostró mayor susceptibilidad en los machos en comparación con las hembras. Ong y colaboradores, 2013, así como otros investigadores, mencionan que existen diferencias sustanciales en el comportamiento entre machos y hembras, así como en la respuesta neurobiológica hacia la ingesta de comida apetecible (Warneke, et al., 2014). Una de las diferencias de comportamiento observadas en nuestro modelo, fue la alta prevalencia de hembras (F0) expuestas a dieta control, con un comportamiento similar al adictivo, respecto al grupo de hembras previamente expuestas a dieta de cafetería. Proponemos que el decremento en la hedonia de este grupo de hembras puede bien estar relacionado a la diferencia en valor recompensante entre la dieta de cafetería durante 9 semanas y la adquisición de la recompensa empleando la caja de comportamiento. Asimismo, dicho comportamiento ya ha sido observado en otros estudios, en los cuales se propone que, dependiendo del modelo y el diseño de estudio, los sujetos control, sin exposición previa a una dieta de cafetería, muestran mayor consumo de alimentos con alto valor calórico en comparación con aquellos con exposición previa a la dieta (Ong, et al, 2013).

Las evidencias que sugieren que el comportamiento, así como los hábitos alimenticios de los padres pueden influir en el comportamiento y el estado de salud de su descendencia, han ido en aumento (Naef, et al., 2011; Wright, et al., 2011; Mennitti, et al., 2015; Wu, et al., 2016). Nuestro modelo valida dichos hallazgos demostrando que, tanto las ratas padres como madres que presentaron un comportamiento similar al adictivo hacia la comida hipercalórica, influyen en el número de descendientes con un comportamiento motivante elevado (similar al adictivo) hacia la obtención de recompensas con alto valor calórico. Además de los resultados que sugieren que, la programación fetal por nutrientes hipercalóricos potencia dicha motivación por la obtención de recompensas hipercalóricas.

En nuestro modelo empleando la plataforma de microarreglos de expresión global, identificamos diversas alteraciones en el perfil de expresión génica en el núcleo accumbens de la descendencia (machos) (F1) de madres con y sin exposición previa a dieta de cafetería. En este sentido, se identificaron un total de 17645 genes mostrando expresión diferencial entre dicho grupo de descendientes macho, de los cuales solo 84 cumplieron con los criterios de corte significativo empleado en este modelo (fold change: 1.7; p<0.05). Dichos cambios transcripcionales pueden afectar a un amplio conjunto de genes, cuya regulación concertada puede orquestar el resultado conductual complejo que caracteriza a la adicción a la comida y el comportamiento similar al adictivo observado en los sujetos de estudio. Estudios previos, ya han evidenciado el impacto de los cambios en la expresión génica sobre el comportamiento adictivo hacia la ingesta de alimentos apetecibles (altamente calóricos), en la descendencia de madres expuestas a dietas hipercalóricas (Naef, et al., 2011; Ong, et al., 2013; Martire, et al., 2014; Li, et al., 2016; Gugusheff, et al., 2016; Wu, et al., 2016; Oginsky, et al., 2016). Destacando la presencia de cambios en la expresión de genes en regiones pertenecientes al circuito de la recompensa. Tales genes incluyen a: los receptores de dopamina DR1 y DR2, el transportador de dopamina DAT, el receptor μ -opioide, la enzima tirosina hidroxilasa, el factor de transcripción BDNF y la histona desacetilasa 4, entre otros previamente descritos en la adicción a diversas drogas; cocaína, heroína, alcohol y anfetaminas (Volkow, et al., 2009; Russo, et al., 2010; Content, 2012; Nestler, 2014).

La superposición de los datos de expresión génica diferencial obtenidos de nuestros grupos de la F1, en bases de datos que integran el conocimiento actual sobre la función biológica de los genes, la actividad proteica, interacciones funcionales y relaciones de orden superior entre proteínas, comprueban los hallazgos detallados anteriormente y además enriquecen la identificación de redes génicas en el Núcleo accumbens de la descendencia con genes implicados en: vías de señalización neuronales y plasticidad neuronal, representadas por los genes Gpr149, Chrm3 y Atp2b4 (Rajman, et al., 2017; Yorgason, et al., 2017); exocitosis vesicular en sinapsis que involucra a los genes Syt17 y Stx1a (Koh and Bellen 2003; Ramoino, et al., 2010; Jurado 2014); reorganizadores y remodeladores del citoesqueleto que incluye a los genes Abi3bp y Sema3e; vías de la respuesta inmune e inflamatoria como los genes Ifit1, Klra5, Pfpl, Kir3dl1 y PPP1R16B; relacionados al metabolismo de lípidos: Liph, Ndst4 y Car10; vías de regulación transcripcional: Polr3k; reguladores del desarrollo placentario y embrionario: Peg10 (Rahat, et al., 2017); genes con funciones diversas que involucran homeostasis de electrolitos, fusión vesicular, reguladores cardiovasculares y pulmonares, señalización celular,

etc.: Nppa, S100-A11-like y Hbb-b1; así como diversos microRNAs con participación en la regulación de la respuesta inmune por infección viral o bacteriana (mir298), procesos patológicos de depresión (mir135b) y regulación de la vía dopaminérgica (mir30a).

En la última parte de nuestro análisis de expresión identificamos a los genes que mostraron sobreexpresión y que tenían asociación con fenómenos adictivos con base a la información que se tiene de cada gen de acuerdo a evidencia bibliográfica. Nuestro trabajo destaca la presencia de los genes: Hbb-b1(Mulligan, et al, 2012), Polr3k (Stacey, et al., 2016), Nst4 (Pan, et al., 2013) y mir30a (Pandey, 2016),en procesos de dependencia o adicción al alcohol; el gen Chr3m con procesos de establecimiento de memoria y aprendizaje posterior a la administración de drogas (Habiba, et al., 2017; Yorgason, et al., 2017);, el gen Ifit1, con procesos de respuesta inmune posterior a la administración de drogas o alteraciones generada por reprogramación por exposición materna a drogas (Crawford, et al., 2006; Eun, et al., 2010); el gen Stx1a, con el tráfico de receptores relacionado a procesos de adicción (Hussain, et al., 2016); y el gen Syt17 con el daño cognitivo dado por reprogramación fetal y en pacientes con Alzheimer (Li, et al., 2016;Öhrfelt, et al., 2016).

Con base en la basta literatura que respalda la funcionalidad de los genes encontrados en nuestro modelo, así como las asociaciones de los mismos con comportamientos adictivos o procesos relacionados a la plasticidad sináptica en modelos de aprendizaje y memoria, nos ha permitido proponer una firma génica de 4 genes, los cuales se encontraron mayormente expresados en aquellos descendientes machos F1 con un comportamiento similar al adictivo. Estos descendientes provienen de madres adictas y con programación fetal por nutrientes hipercalóricos (provenientes de madres expuestas a dieta de cafetería durante embarazo y lactancia). La firma génica final exhibe la presencia de Syt17, Stx1a, IFIT1 y Peg10 como los candidatos potencialmente importantes en la modulación de un fenotipo adictivo hacia la comida y/o los procesos que llevan al desarrollo de la misma. Sin embargo, a la fecha desconocemos la implicación que tienen dichos genes en el fenotipo adictivo y su modulación durante el desarrollo embrionario, para lo cual se requiere un análisis más profundo y detallado.

IX. CONCLUSIÓN

- En este trabajo demostramos que los machos exhiben una mayor tendencia a presentar un comportamiento semejante a la adicción en comparación con las Hembras, y que este comportamiento se transmite a la descendencia. Además, identificamos que la reprogramación fetal por nutrientes exacerba la motivación hacia la búsqueda de la recompensa hipercalórica en la descendencia.
- Empleando la plataforma de microarreglos de expresión global identificamos que los sujetos con comportamiento Adictivo exhiben una firma genómica que involucra a 8 genes presentes en los procesos de exocitosis de neurotransmisores (Syt17, Stx1a), señalización sináptica (Chrm3, Gpr149); remodelación del citoesqueleto y plasticidad sináptica (Sema3e, Abi3bp), y en los procesos de alteración en el consumo de alcohol tanto en humanos como en modelos animales (Hbb-b1, Polr3k, Mir30a).
- La exposición materna a una dieta hipercalórica, promueve el incremento en la expresión de genes con funciones asociadas con la respuesta inflamatoria, procesos metabólicos (S100A11, Ifit1, Polr3k, Ppp1r16b), y señalización sináptica (Mir30a).

X. PERSPECTIVAS

- Validar la firma de genes propuesta mediante ensayos de PCR en tiempo real.
- Realizar ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de los genes de la firma y ver el efecto sobre el comportamiento adictivo.
- Realizar un análisis de microRNAs en la regulación de la expresión génica y sus posibles efectos sobre el comportamiento.
- Evaluar la implicación de posibles mecanismos epigenéticos en la programación y regulación de la expresión génica de la descendencia.

XI. PRODUCCIÓN CIENTIFICA

1. Maldonado-Ruiz R, **Montalvo-Martínez L**, Fuentes-Mera L, Camacho A. *Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes*. Nutrition & Diabetes. 2017;7(3):e254-.
2. Camacho Alberto, **Montalvo-Martinez Larisa**, Cárdenas-Pérez Robbi E., Fuentes-Mera Lizeth, Garza-Ocañas Lourdes. *-Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in offspring*. Behavioural Brain Research. 2017;330:46-55.

XII. REFERENCIAS

1. Alsio J, Olszewski PK, Norback AH, et al. Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience*. 2010;171(3):779-787. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.09.046.
2. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005;308(5727):1466-1469. doi:10.1126/science.1108190.
3. Bale TL, Baram TZ, Brown AS, et al. Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders. *Biological psychiatry*. 2010;68(4):314-319.
4. Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):332-344. doi:10.1038/nrn3818.
5. Bannon MJ, Johnson MM, Michelhaugh SK, et al. A Molecular Profile of Cocaine Abuse Includes the Differential Expression of Genes that Regulate Transcription, Chromatin, and Dopamine Cell Phenotype. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(9):1-9. doi:10.1038/npp.2014.70.
6. Barquera S, Campos-nonato I, Hernández-barrera L. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos , ENSANUT 2012. 2013;55(1):151-160.
7. Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*. 2000;25(3):515-532. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774721>.
8. Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;191(3):391-431. doi:10.1007/s00213-006-0578-x.
9. Bohacek J, Mansuy IM. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. *Nat Rev Genet*. 2015;16(11):641-652. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3964>.
10. Byrnes EM. Transgenerational consequences of adolescent morphine exposure in female rats: effects on anxiety-like behaviors and morphine sensitization in adult offspring. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;182:537–544.
11. Byrnes JJ, Babb JA, Scanlan VF, Byrnes EM. Adolescent opioid exposure in female rats: transgenerational effects on morphine analgesia and anxiety-like behavior in adult offspring. *Behav Brain Res*. 2011;218:200–205.
12. Byrnes JJ, Johnson NL, Carini LM, Byrnes EM. Multigenerational effects of adolescent morphine exposure on dopamine D2 receptor function. *Psychopharmacology*. 2013;227:263–272.
13. Cadet JL, Brannock C, Jayanthi S, Krasnova IN. Transcriptional and Epigenetic Substrates of Methamphetamine Addiction and Withdrawal: Evidence from a Long-Access Self-Administration Model in the Rat. *Mol Neurobiol*. 2015;51(2):696-717. doi:10.1007/s12035-014-8776-8.
14. Carter A, Hendrikse J, Lee N, Verdejo-garcia A, Andrews Z, Hall W. The Neurobiology of “Food Addiction” and Its Implications for Obesity Treatment and Policy. 2016;(May):1-24. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-050909.
15. Cecchini M, Sassi F, Lauer JA, Lee YY, Guajardo- Barron V, Chisholm D. Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness. *Lancet*. 2010;376(9754):1775-84.
16. Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW. Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci*. 2003;23:2488–2493.

17. Contet C. Gene Expression Under the Influence: Transcriptional Profiling of Ethanol in the Brain. *Curr Psychopharmacol.* 2012;1(4):301-314. doi:10.2174/2211556011201040301.
18. Cornish JL, Kalivas PW. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci.* 2000;20(15):RC89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899176>.
19. Crawford FC, Wood ML, Wilson SE, et al. Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J Neurochem.* 2006;97(3):662-674. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03760.x.
20. Dávila-Torres J, González-Izquierdo J, Barrera-Cruz A. Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(2):240-249.
21. Deng JV, Rodriguez RM, Hutchinson AN, Kim I-H, Wetsel WC, West AE. MeCP2 in the Nucleus Accumbens Contributes to Neural and Behavioral Responses to Psychoactive Stimulants. *Nature Neuroscience.* 2010;13(9):1128-1136. doi:10.1038/nn.2614.
22. DiLeone RJ, Taylor JR, Picciotto MR. The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nat Neurosci.* 2012;15(10):1330-1335. doi:10.1038/nn.3202.
23. Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, et al. Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab.* 2016;23(2):369-378. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.004.
24. Du Hoffmann J, Nicola SM. Activation of Dopamine Receptors in the Nucleus Accumbens Promotes Sucrose-Reinforced Cued Approach Behavior. *Front Behav Neurosci.* 2016;10(July):144. doi:10.3389/fnbeh.2016.00144.
25. Ersche KD, Jones PS, Williams GB, Turton AJ, Robbins TW, Bullmore ET. Abnormal brain structure implicated in stimulant drug addiction. *Science.* 2012;335(6068):601-604. doi:10.1126/science.1214463.
26. Eun JW, Kwack SJ, Noh JH, et al. Identification of post-generation effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on the mouse brain by large-scale gene expression analysis. *Toxicol Lett.* 2010;195(1):60-67. doi:10.1016/j.toxlet.2010.02.013.
27. Franco S. Obesity Update 2012. USA: Organization for the Economic Cooperation and Development; 2012. Texto libre en <http://www.oecd.org/health/49716427.pdf>
28. Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2012;354(1-2):3-8. doi:10.1016/j.mce.2011.10.004.
29. Gugusheff JR, Bae SE, Rao A, et al. Sex and age-dependent effects of a maternal junk food diet on the mu-opioid receptor in rat offspring. *Behav Brain Res.* 2016;301:124-131. doi:10.1016/j.bbr.2015.12.027.
30. Habiba R, Aamra M, Touqueer A. Role of Cholinergic Receptors in Memory Retrieval Depends on Gender and Age of Memory. *Behav Brain Res.* 2017. doi:10.1016/j.bbr.2017.05.017.
31. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 2001;60:5–20.
32. He F, Lidow IA, Lidow MS. Consequences of paternal cocaine exposure in mice. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28:198–209.
33. Holland ML, Lowe R, Caton PW, et al. Early-life nutrition modulates the epigenetic state of specific rDNA genetic variants in mice. *Science.* 2016;353(6298):495-498. doi:10.1126/science.aaf7040.
34. Host L, Dietrich JB, Carouge D, Aunis D, Zwiller J. Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition. *J. Psychopharmacol.* 2011;25: 222–229.

35. Hussain S, Ringsevjen H, Egbenya DL, Skjervold TL, Davanger S. SNARE Protein Syntaxin-1 Colocalizes Closely with NMDA Receptor Subunit NR2B in Postsynaptic Spines in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2016;9(February):1-13. doi:10.3389/fnmol.2016.00010.
36. Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nature Neurosci.* 2010; 13:1120–1127.
37. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003; 33(Suppl):245–254.
38. Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci.* 2010;13(5):635-641. doi:10.1038/nn.2519.
39. Jurado S (2014) The dendritic SNARE fusion machinery involved in AMPARs insertion during long-term potentiation. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8:407.
40. Kalivas PW. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Publ Gr.* 2009;10(8):561-572. doi:10.1038/nrn2515.
41. Kelz MB, Chen J, Carlezon WAJ, et al. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature.* 1999;401(6750):272-276. doi:10.1038/45790.
42. Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(11):638-651. doi:10.1038/nrn3105.
43. Killgore WDS, Young AD, Femia LA, Bogorodzki P, Rogowska J, Yurgelun-Todd DA. Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. *Neuroimage.* 2003;19(4):1381-1394. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00191-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00191-5).
44. Killinger CE, Robinson S, Stanwood GD. Subtle biobehavioral effects produced by paternal cocaine exposure. *Synapse.* 2012;66:902–908.
45. Koh TW, Bellen HJ. Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 2003; 26:413–422.
46. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(1):217-238. doi:10.1038/npp.2010.4.
47. Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT et al. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 2005;48: 303–314.
48. Li XY, Wang F, Chen GH, et al. Inflammatory insult during pregnancy accelerates age-related behavioral and neurobiochemical changes in CD-1 mice. *Age (Omaha).* 2016;38(3). doi:10.1007/s11357-016-9920-3.
49. Li Y, Acerbo MJ, Robinson TE. The induction of behavioural sensitization is associated with cocaineinduced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.* 2004;20(6):1647–54.
50. Ludwig DS. Relation between consumption of sugar sweetened drinks and childhood obesity: a prospective observational analysis. *Lancet.* 2001;357(9255):505-508.
51. Luzzo KM, Wang Q, Purcell SH, et al. High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. *PLoS One.* 2012;7(11). doi:10.1371/journal.pone.0049217.
52. Malik AN, Vierbuchen T, Hemberg M, et al. Genome-wide identification and characterization of functional neuronal activity-dependent enhancers. *Nat Neurosci.* 2014;17(10):1330-1339. doi:10.1038/nn.3808.

53. Mancino S, Burokas A, Gutiérrez-Cuesta J, et al. Epigenetic and Proteomic Expression Changes Promoted by Eating Addictive-Like Behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(12):2788-2800. doi:10.1038/npp.2015.129.
54. Martin TA, Jayanthi S, McCoy MT, et al. Methamphetamine causes differential alterations in gene expression and patterns of histone acetylation/hypoacetylation in the rat nucleus accumbens. *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0034236.
55. Martire SI, Maniam J, South T, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. *Behav Brain Res*. 2014;265:132-141.
56. Maze I, Covington HE, Dietz DM, et al. Essential Role of the Histone Methyltransferase G9a in Cocaine-induced Plasticity. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5962):213. doi:10.1126/science.1179438.
57. Maze I, Nestler EJ. The epigenetic landscape of addiction. *Ann NY Acad Sci*. 2011; 1216:99–113.
58. McClung CA, Nestler EJ. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci*. 2003;6:1208–1215.
59. McNair LF, Kohlmeier KA. Prenatal nicotine is associated with reduced AMPA and NMDA receptor-mediated rises in calcium within the laterodorsal tegmentum: a pontine nucleus involved in addiction processes. *J Dev Orig Health Dis*. 2015;6(3):225-241. doi:10.1017/S2040174414000439.
60. Mennittia LV, Oliveirab JL, Moraisa CA, Estadellaa D, Oyamab LM, Oller do Nascimento CM, Pisania LP. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J. Nutr. Biochem*. 2015; 99-111.
61. Mulligan MK, Rhodes JS, Crabbe JC, Mayfield RD, Harris RA, Ponomarev I. NIH Public Access. 2012;35(4):659-670. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01384.x. Molecular.
62. Naef L, Moquin L, Dal Bo G, Giros B, Gratton A, Walker CD. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. *Neuroscience*. 2011;176:225-236. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.037.
63. Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 2014;76(PART B):259-268. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.004.
64. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(2):119-128. doi:10.1038/35053570.
65. Nestler EJ. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363(1507):3245–55.
66. Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovsky A, Schaefer A, Nestler EJ. Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science*. 2010; 327:213–216.
67. Oginsky MF, Goforth PB, Nobile CW, Lopez-santiago L, Ferrario CR. Accepted Article Preview: Published ahead of advance online publication. 2016;(February):1-25. doi:10.1038/npp.2016.111.
68. Öhrfelt A, Brinkmalm A, Dumurgier J, et al. The pre-synaptic vesicle protein synaptotagmin is a novel biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8(1):41. doi:10.1186/s13195-016-0208-8.
69. Ong ZY, Wanansuria AF, Lin MZP, Hiscock J, Muhlhausler BS. Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite*. 2013;65:189-199. doi:10.1016/j.appet.2013.01.014.

70. Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y Sobrepeso. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. Acceso el 18 de diciembre de 2015.
71. Pan Y, Luo X, Liu X, et al. Genome-wide association studies of maximum number of drinks. *J Psychiatr Res.* 2013;47(11):1717-1724. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.07.013.
72. Pandey SC. A critical role of brain-derived neurotrophic factor in alcohol consumption. *Biol Psychiatry.* 2016;76(6):427-429. doi:10.1016/j.biopsych.2015.12.020.
73. Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, et al. Distinct Patterns of ΔFosB Induction in Brain by Drugs of Abuse. *Synapse (New York, NY).* 2008;62(5):358-369. doi:10.1002/syn.20500.
74. Rahat B, Mahajan A, Bagga R, Hamid A, Kaur J. Epigenetic modifications at DMRs of placental genes are subjected to variations in normal gestation, pathological conditions and folate supplementation. *Sci Rep.* 2017;7(January):40774. doi:10.1038/srep40774.
75. Rajman M, Metge F, Fiore R, et al. A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. *EMBO J.* 2017:e201695748. doi:10.15252/embj.201695748.
76. Ramoino P, Milanese M, Candiani S, et al. Gamma-amino butyric acid (GABA) release in the ciliated protozoon Paramecium occurs by neuronal-like exocytosis. *J Exp Biol.* 2010;213(Pt 8):1251-1258. doi:10.1242/jeb.039594.
77. Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, Xiao GH, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kerstetter KA, Kippin TE, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron.* 2007; 56:517–529.
78. Rijlaarsdam J, Cecil CAM, Walton E, et al. Prenatal unhealthy diet, insulin-like growth factor 2 gene (IGF2) methylation, and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in youth with early-onset conduct problems. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip.* 2016. doi:10.1111/jcpp.12589.
79. Robison AJ, Nestler EJ. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12:623–637.
80. Robison AJ, Vialou V, Mazei-Robison M, Feng J, Kourrich S, Collins M, Wee SM, Koob G, Turecki G, Neve R, Thomas M, Nestler EJ. Behavioral and structural responses to chronic cocaine require a feed-forward loop involving ΔFosB and CaMKII in the nucleus accumbens shell. *J Neurosci.* 2013 in press.
81. Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Malenka RC, Nestler EJ. NIH Public Access. 2011;33(6):267-276. doi:10.1016/j.tins.2010.02.002.
82. Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Malenka RC, Nestler EJ. The Addicted Synapse: Mechanisms of Synaptic and Structural Plasticity in Nucleus Accumbens. *Trends in neurosciences.* 2010;33(6):267-276. doi:10.1016/j.tins.2010.02.002.
83. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. 2013. doi:10.1038/nrn3381.
84. Sadri-Vakili G. Cocaine Triggers Epigenetic Alterations in the Corticostriatal Circuit. *Brain research.* 2015;1628(0 0):50-59. doi:10.1016/j.brainres.2014.09.069.
85. Schroeder FA, Penta KL, Matevossian A, Jones SR, Konradi C, Tapper AR, Akbarian S. Drug-induced activation of dopamine D(1) receptor signaling and inhibition of class I/II histone deacetylase induce chromatin remodeling in reward circuitry and modulate cocaine-related behaviors. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33:2981–2992.
86. Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* 2007;30(5):203-210. doi:10.1016/j.tins.2007.03.007.
87. Scully T. Public health: Society at large. *Nature.* 2014;508(7496):S50-S51. <http://dx.doi.org/10.1038/508S50a>.

88. Shen HY, Kalda A, Yu L, Ferrara J, Zhu J, Chen JF. Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and DeltaFosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice. *Neuroscience*. 2008; 157:644–655.
89. Skinner MK. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. *Birth Defects Res. C Embryo Today*. 2011a; 93:51–55.
90. Stacey D, Lourdusamy A, Ruggeri B, et al. A translational systems biology approach in both animals and humans identifies a functionally related module of accumbal genes involved in the regulation of reward processing and binge drinking in males. *J Psychiatry Neurosci*. 2016;41(3):192-202. doi:10.1503/jpn.150138.
91. Sullivan EL, Nousen EK, Chamlou KA. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiol Behav*. 2014;123:236-242. doi:10.1016/j.physbeh.2012.07.014.
92. Ulery PG, Rudenko G, Nestler EJ. Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J Neurosci*. 2006;26:5131–5142.
93. Ulery-Reynolds PG, Castillo MA, Vialou V, Russo SJ, Nestler EJ. Phosphorylation of DeltaFosB mediates its stability in vivo. *Neuroscience*. 2009;158:369–372.
94. Vassoler FM, White SL, Schmidt HD, Sadri-Vakili G, Pierce RC. Epigenetic Inheritance of a Cocaine Resistance Phenotype. *Nature neuroscience*. 2013;16(1):42-47. doi:10.1038/nn.3280.
95. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *NIH Public Access*. 2009;56 (Suppl 1):3-8. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.05.022.Imaging.
96. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol. Learn. Mem* 2002a;78:610–624.
97. Volkow ND, Wang GJ, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. *Trends Cogn Sci*. 2011;15(1):37-46. doi:10.1016/j.tics.2010.11.001.
98. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Baler R. Food and drug reward: overlapping circuits in human obesity and addiction. *Curr Top Behav Neurosci*. 2012;11:1-24. doi:10.1007/7854_2011_169.
99. Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci*. 2005;8(5):555-560. doi:10.1038/nn1452.
100. Warneke W, Klaus S, Fink H, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;116:45-54. doi:10.1016/j.pbb.2013.11.016.
101. Wise RA, Koob GF. The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(2):254-262. doi:10.1038/npp.2013.261.
102. Wise RA. Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res*. 1978;152:215–247.
103. Wise RA. Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behav. Brain Sci*. 1982;5:39–87.
104. Wise, RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature Rev. Neurosci*. 2004; 5:483–494.
105. Wojcicki JM, Jimenez-Cruz A, Bacardi-Gascon M, Schwartz N, Heyman MB. Bimodal distribution of risk for childhood obesity in urban Baja California, Mexico. *J Urban Health*. 2012;89(4):628-38. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535143/>

- 106.Wright TM, Fone KCF, Langley-Evans SC, Voigt JPW. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(8):785-793. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.09.007.
- 107.Wu KLH, Wu CW, Tain YL, et al. Environmental stimulation rescues maternal high fructose intake-impaired learning and memory in female offspring: Its correlation with redistribution of histone deacetylase 4. *Neurobiol Learn Mem.* 2016;130:105-117. doi:10.1016/j.nlm.2016.02.004.
- 108.Yorgason JT, Zeppenfeld DM, Williams JT. Cholinergic Interneurons Underlie Spontaneous Dopamine Release in Nucleus Accumbens. *J Neurosci.* 2017;37(8):2086-2096. doi:10.1523/JNEUROSCI.3064-16.2017.
- 109.Zachariou V, Bolanos CA, Selley DE, Theobald D, Cassidy MP, Kelz MB, Shaw-Lutchman T, Berton O, Sim-Selley LJ, Dileone RJ, Kumar A, Nestler EJ. An essential role for DeltaFosB in the nucleus accumbens in morphine action. *Nat Neurosci.* 2006;9:205–211.

XIII. ANEXOS

Table 2.1 Thermal Cycler Programs

Program	Heated Lid Temp	Alternate Protocol ^a	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Volume
First-Strand cDNA Synthesis	42°C	105°C	25°C, 60 min	42°C, 60 min	4°C, 2 min		10 µL
Second-Strand cDNA Synthesis	RT or disable	Lid open	16°C, 60 min	65°C, 10 min	4°C, 2 min		30 µL
In Vitro Transcription cRNA Synthesis	40°C	40°C oven	40°C, 16 hr	4°C, hold			60 µL
2nd-Cycle Primers-cRNA Annealing	70°C	105°C	70°C, 5 min	25°C, 5 min	4°C, 2 min		28 µL
2nd-Cycle ss-cDNA Synthesis	70°C	105°C	25°C, 10 min	42°C, 90 min	70°C, 10 min	4°C, hold	40 µL
RNA Hydrolysis	70°C	105°C	37°C, 45min	95°C, 5 min	4°C, hold		44 µL
Fragmentation	93°C	105°C	37°C, 60 min	93°C, 2 min	4°C, hold		48 µL
Labeling	70°C	105°C	37°C, 60 min	70°C, 10 min	4°C, hold		60 µL
Hybridization Control	65°C	105°C	65°C, 5 min				Variable
Hybridization Cocktail	99°C	105°C	95°C or 99°C, 5 min	45°C, 5 min			Variable

^aFor thermal cyclers that lack a programmable heated lid.