### UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Facultad de Medicina

# Estudio de la herencia transgeneracional de la estructura y función cerebral implicadas en conducta similar a la ansiedad

y depresión

Por

### M.C. LUIS ANGEL TRUJILLO VILLARREAL

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTORADO EN

CIENCIAS con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería

Genética

Septiembre 2022

Estudio de la herencia transgeneracional de la estructura y función cerebral implicadas en conducta similar a la ansiedad y depresión.

Aprobación de Tesis:

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

ARZA VILLARREAL DR. C. EDUARDO ADRIA

Co-director de Tesis

DRA. C. ANA MARIA G. RIVAS ESTILLA

Miembro de la Comisión de Tesis

DRA. C. SONIA AMELIA LOZANO SEPÚLVEDA

Miembro de la Comisión de Tesis

ARIVAS DR. C. GERARDO RAY MUNDO PADILI Miembro de la Comisión de Tesis

DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

### AGRADECIMIENTOS

### Quiero agradecer a:

La Facultad de Medicina UANL y al programa de posgrado que me brindaron la oportunidad de realizar este trabajo dentro de su establecimiento educativo.

A mis profesores del departamento de Bioquímica quienes con la enseñanza de su conocimiento hicieron que pueda crecer día a día como profesional.

Al Dr. C. Alberto Camacho, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza, paciencia y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo y mi formación como investigador y sobre todo le agradezco la confianza y amistad brindada.

Al Dr. C. Eduardo Garza por brindarme su enseñanza, asesoramiento y apoyo que me motiva a desarrollarme como investigador.

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

A mis compañeros del laboratorio Diego, Maya, Roger, Larisa, Gaby y Martín por los consejos y risas que compartimos. Aquellos amigos que se convierten en amigos de vida y aquellos que serán mis colegas.

### **DEDICATORIA**

A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, siempre te llevo conmigo y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, se que estas festejando este momento especial como lo es para mí. A mi madre, por demostrarme siempre tu cariño y esas largas charlas. A mis hermanos, que crecimos juntos y siempre nos desearemos lo mejor en nuestras vidas. A Dinora, por ser mi confidente, cómplice, amiga y mi todo, por ser tan tú y apoyarme siempre en las buenas y en las malas, por decir si a compartir nuestras vidas juntos, por ser mi esposa y porque mi corazón te pertenece, te amo.

# **ÁREA DE TRABAJO**

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

# INDICE

INDICE	6
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS	13
CAPITULO 1	16
INTRODUCCIÓN	16
CAPITULO 2	20
ANTECEDENTES	20
2.1 Trastornos del estado de ánimo	20
2.1.1 Ansiedad	21
2.1.1.2 Neurobiología de los trastornos de ansiedad	23
2.1.1.3 La ansiedad y la amígdala	
2.1.1.4 Estudio de los trastornos de ansiedad en modelos animales.	30
2.1.2 Depresión	33
2.1.2.1 Neurobiología de la depresión	35
2.1.2.2 Mecanismos neurofisiológicos que contribuyen a los cambios en la es cerebral	tructura 
2.2 Sobrealimentación en México y el mundo	42
2.3. Obesidad y trastornos emocionales	43
2.4 Programación fetal y su contribución al desarrollo de alteraciones condu	ictuales 43
2.5 Herencia intergeneracional y transgeneracional de fenotipos conductual	es en la
descendencia	
CAPITULO 3	
JUSTIFICACIÓN	
CAPITULO 4	50
HIPÓTESIS	50
CAPITULO 5	51
OBJETIVOS	51

5.1 Objetivo General	. 51
5.2 Objetivos específicos	. 51
CAPITULO 6	. 52
MATERIAL Y MÉTODOS	. 52
6.1 Material de Laboratorio	. 52
6.2 Metodología	. 53
6.2.1 Modelos animales	. 53
6.2.2 Programación Fetal de la descendencia F1	. 54
6.2.3 Fenotipificación de conducta similar a la ansiedad en la descendencia	. 56
6.2.3.1 Prueba de campo abierto	. 56
6.2.3.2 Prueba de alimentación novedosa suprimida	. 57
6.2.3.3 Prueba de cámaras iluminada y oscura	. 57
6.2.3.4 Prueba de laberinto elevado	. 58
6.2.4 Fenotipificación de conducta similar a la depresión en la descendencia	. 59
6.2.4.1 Prueba de suspensión de la cola	. 59
6.2.4.2 Prueba de nado forzado	. 60
6.2.5 Herencia transgeneracional del comportamiento similar a la depresión o la ansiedad	. 62
6.2.6 Clasificación del fenotipo conductual mediante análisis de componentes principales	. 63
6.2.7 Perfusión intracardiaca	. 64
6.2.8 Obtención de imágenes de Resonancia Magnética Nuclear	. 65
6.2.9 Preparación de datos provenientes de imágenes por resonancia magnética	. 67
6.2.10 Análisis de imágenes de resonancia magnética de imagen por morfometría	60
Dasado en deformación	. 69
6.2.11 Analisis de imagenes de resonancia magnetica de imagen basado en difusion	. /1
6.2.12 Analisis de inmunomarcadores de tejidos cerebrales	. 72
6.2.12.1 Procesamiento de tejidos en paralina e inmunonistoquímica	. 72
6.2.12.2 Analisis de tejidos cerebrales por tinción nematoxilina	. 73
6.2.12.3 Analisis de tejidos cerebrales por tinción de kiuver barrera	. 74
0.2.13 Analisis estadístico	. 75
CAPITULO 7	. 76
RESULTADOS	. 76

7.1 Pruebas Conductuales	5
7.1.1 La programación fetal de madres por dieta con alto contenido energético induce conducta depresiva de manera intergeneracional en la descendencia	5
7.1.2 La programación fetal de madres por dieta con alto contenido energético induce conducta ansiosa con efecto transgeneracional	Ð
7.1.2.1 Conducta similar a la ansiedad en la descendencia F1	9
7.1.2.2 La programación fetal por dieta de cafetería favorece la herencia transgeneracional de la conducta de ansiedad en la descendencia	)
7.1.2.3 El fenotipo ansioso prevalece transgeneracionalmente en los modelos animales expuestos prenatalmente a dieta cafetería	3
7.2 Análisis de estructura cerebral86	5
7.2.1 La programación fetal de madres por dieta de cafetería muestra alteraciones en la estructura cerebral relacionada al fenotipo ansioso que se hereda transgeneracionalmente	ō
7.2.2 La descendencia programada por dieta cafetería muestra alteración de volumen en regiones específicas identificadas por MBD en cada generación de descendencia relacionado a su fenotipo	2
7.2.3 La descendencia expuesta a dieta cafetería exhibe alteración microestructural cerebral relacionada con el fenotipo de ansiedad hasta la generación F3	3
7.3 La descendencia expuesta a dieta cafetería exhibe alteración morfológica cerebral	)
CAPITULO 8	3
DISCUSIÓN	3
CAPITULO 9	2
CONCLUSIÓN112	2
REFERENCIAS	3

# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Material biológico y no biológico
Tabla 2 Distribución de macronutrientes de las distintas dietas empleadas
Tabla 3 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON no ansioso vsF1 CON ansioso
Tabla 4 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON no ansioso vsF3 CON ansioso
Tabla 5 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON no ansioso vsF1 CAF ansioso
Tabla 6 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON no ansioso vsF3 CAF ansioso
Tabla 7 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON no ansioso vsF1 CAF no ansioso
Tabla 8 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON no ansioso vsF3 CAF no ansioso151
Tabla 9 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON ansioso vs F1CAF ansioso.152
Tabla 10 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F2 CON ansioso vsF2 CAF ansioso
Tabla 11 Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON ansioso vsF3 CAF ansioso154
<b>Tabla 12</b> Valores de p de la comparación de FA entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F1155
<b>Tabla 13</b> Valores de p de la comparación de FA entre el grupo clasificado como sin ansiedad yansiedad de los grupos de control o cafetería en la descendencia F2 <b>157</b>
<b>Tabla 14</b> Valores de p de la comparación de FA entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F3 <b>158</b>
Tabla 15Valores de p de la comparación de ADC entre los grupos clasificados como sinansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F1159

<b>Tabla 16</b> Valores de p de la comparación de ADC entre los grupos clasificados como sinansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F2 <b>16</b>	2
Tabla 17 Valores de p de la comparación de ADC entre los grupos clasificados como sin   ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F3 16	2
<b>Tabla 18</b> Valores de p de la comparación de AD entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F116	4
<b>Tabla 19</b> Valores de p de la comparación de AD entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F216	5
<b>Tabla 20</b> Valores de p de la comparación de AD entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F316	7
<b>Tabla 21</b> Valores de p de la comparación de RD entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F116	8
<b>Tabla 22</b> Valores de p de la comparación de RD entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F216	9
<b>Tabla 23</b> Valores de p de la comparación de RD entre los grupos clasificados como sin ansiedady ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F317	1

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuitos neuronales implicados en comportamientos relacionados con la ansiedad en el cerebro de roedores 24
Figura 2. Circuitos inhibitorios de la amígdala que están implicados en la regulación del comportamiento relacionado con la ansiedad
Figura 3. Interacción entre depresión e inflamación 41
Figura 4. Representación de la hipótesis de la programación fetal 45
Figura 5. Representación de los patrones de herencia de la generación padre (FO) al hijo (F1), nieto (F2) y bisnieto (F3) en humanos y animales
Figura 6. Línea de tiempo seguida para la generación de los diferentes grupos de estudio 55
Figura 7. Representación de las cajas utilizadas para las pruebas conductuales
Figura 8. Representación de las cajas utilizadas para las pruebas conductuales
Figura 9. Línea de tiempo seguida para la realización de las pruebas conductuales
Figura 10. Diseño de estudio del efecto inter y transgeneracional de la dieta materna
Figura 11. Representación de imágenes obtenidas por resonancia magnética de imagen y su posterior tratamiento preprocesamiento
Figura 12. Comparaciones de los resultados conductuales similares a la depresión
Figura 13. Comparaciones de los resultados conductuales similares a la ansiedad
Figura 14. Gráficas del análisis por componentes principales
Figura 15. Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F1
Figura 16. Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F2 y F3
Figura 17. Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F1 y F2 tomando en cuenta el fenotipo
Figura 18. Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F3 tomando en cuenta el fenotipo

<b>Figura 19</b> . Resultados del análisis de imágenes de resonancia de imagen basados en difusión de las 12 regiones de interés de la generación F2 y F3 tomando en cuenta el fenotipo
Figura 20. Análisis de la tinción H&E en DG 100
Figura 21. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica con marcador GFAP en hipocampo. 101
Figura 22. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica con marcador SYP en hipocampo 102
Figura 23. Circuito cerebelo-tálamo corteza

## ABREVIATURAS

Nac	Núcleo accumbens
Amy	Amígdala
Нрр	Hipocampo
PFC	Corteza prefrontal
Lb	Lóbulo
MRI	Resonancia Magnética
MCL	Mesocorticolímbico
TDM	Trastorno depresivo mayor
OF	Campo abierto
NSFT	Prueba alimentación suprimida
TS	Suspensión de cola
EM	Laberinto elevado
FST	Nado forzado
DTI	Imagen de tensor difusión
fMRI	Resonancia magnética funcional
ACC	corteza cingulada anterior
GAD	trastorno de ansiedad generalizada
ТОС	trastorno obsesivo-compulsivo
ТЕРТ	trastorno de estrés postraumático
SAD	trastorno de ansiedad social
vHPC	hipocampo ventral
РЕТ	tomografía por emisión de positrones
ТС	tomografía computarizada

#### RESUMEN

La exposición prenatal a dietas con alto contenido energético promueve alteraciones en el comportamiento de la descendencia, un proceso conocido como programación fetal (PF). Las alteraciones conductuales en la descendencia pueden conservarse transgeneracionalmente y heredarse hasta la tercera generación. En esta tesis se caracterizó en un modelo murino el efecto transgeneracional de la PF por exposición a dieta con alto contenido energético en el desarrollo de conductas similar a la depresión y ansiedad, y su correlación con alteraciones de la estructura cerebral. Empleamos ratas Wistar hembras alimentadas con dieta de cafetería antes, durante y después del embarazo. Evaluamos la conducta similar a la ansiedad y depresión en la descendencia empleando las pruebas: Campo abierto (OF), alimentación novedosa suprimida (NSFT), laberinto elevado (EM), suspensión de cola (TS) y nado forzado (FST). Las alteraciones macro y microestructurales se estudiaron por resonancia magnética de imagen estructural y basado en difusión, respectivamente. Los resultados indican que la descendencia expuesta prenatalmente a dieta de cafetería muestra índices de ansiedad caracterizados por una mayor estadía en las orillas de la arena durante la OF, en la latencia para alimentarse en NSFT y en el tiempo en los brazos cerrados en EM. Se identificaron cambios en el volumen de la amígdala, el cerebelo, el hipocampo y el hipotálamo de manera transgeneracional. Nuestros hallazgos revelan que la PF con dieta cafetería promueve la herencia transgeneracional de cambios de la estructura cerebral y del comportamiento similar a la ansiedad.

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

#### ABSTRACT

Prenatal exposure to high-energy diets promotes behavioral alterations in offspring, a process known as fetal programming (FP). Behavioral disturbances in offspring can be conserved transgenerationally and inherited up to the third generation. In this thesis, the transgenerational effect of FP due to exposure to a high-energy diet on the development of behaviors similar to depression and anxiety, and its correlation with alterations in brain structure, was characterized in a murine model. We used female Wistar rats fed a cafeteria diet before, during and after pregnancy. We assessed anxiety and depression-like behavior in the offspring using the tests: Open Field (OF), Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT), Elevated Maze (EM), Tail Suspension (TS), and Forced Swim (FST). The F1 or F2 offspring were mated with female rats to produce the F2 and F3 offspring, respectively. Macro and microstructural alterations were studied by structural and diffusion-based magnetic resonance imaging, respectively. The results indicate that the offspring (F1, F2 and F3) exposed prenatally to a cafeteria diet show anxiety indices characterized by a greater stay on the shores of the arena during OF, in the latency to feed in NSFT and in the time in arms closed in EM. Volume changes in the amygdala, cerebellum, hippocampus, and hypothalamus were identified in a transgenerational manner. Likewise, greater fractional anisotropy and axial diffusivity were identified in the amygdala, while a greater apparent diffusion coefficient was found in the corpus callosum and greater axial diffusivity in the hippocampus. Our findings reveal that cafeteria diet FP promotes the transgenerational inheritance of anxiety-like behavioral and brain structural changes.

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

#### **CAPITULO 1**

#### INTRODUCCIÓN

Los trastornos del estado de ánimo son enfermedades psiquiátricas comunes e incapacitantes que afectan a los individuos mundialmente y causan un gran impacto negativo en la salud pública (Yksel & Öngür, 2010). Los trastornos depresivos y ansiosos representan un alto porcentaje de los trastornos del estado de ánimo e imponen una carga severa a las personas infligidas y son cada vez más frecuentes en la sociedad moderna (Marsden, 2013). Los desórdenes de ansiedad se refieren a un grupo de trastornos mentales caracterizados por sentimientos de ansiedad, preocupación y miedo excesivo, que incluyen el trastorno de ansiedad generalizada (GAD), el trastorno de pánico, las fobias, el trastorno de ansiedad social, el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) y el trastorno de estrés postraumático (TEPT) (American Psychiatric Association, 2013b). Dichos trastornos muestran un amplio espectro de manifestaciones neurológicas que se presentan como de leves a graves, en donde la inquietud, fatiga, irritabilidad y dificultades de concentración son predominantes (American Psychiatric Association, 2013a). En el año 2015, se estimó que el 3,6 % de la población mundial mostró un criterio de trastornos de ansiedad, en donde las mujeres presentaron el mayor porcentaje respecto a los hombres (4,6 % vs 2,6 %) (World Health Organization, 2017). Además, revisiones sistemáticas y de metanálisis recientes sugieren que durante la pandemia de COVID-19, la prevalencia de los síntomas de ansiedad aumentó a nivel mundial, independientemente del sexo, la edad, la raza o la ubicación geográfica (Deng et al., 2021; Sahebi et al., 2021; Schafer et al., 2022).

Por otro lado, la depresión se caracteriza por una pérdida de interés o de placer de manera prolongada que causan un malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral y que afecta a otras áreas importantes del funcionamiento fisiológico (American Psychiatric Association, 2013b). En México, el 29.9% de individuos de 12 años y más, han mostrados episodios con sentimientos de depresión. Además, de este porcentaje, el 10.5% lo presenta diariamente, 12.4% semanalmente, 11.6% mensualmente y un 65.5% anualmente (INEGI, 2015). En este concepto, la depresión en la población mundial puede alcanzar más de 300 millones de personas afectadas con mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres (WHO, 2018).

Numerosos estudios han mostrado evidencia contundente del papel del medio ambiente prenatal como un inductor de alteraciones en la conducta de los individuos (Ben-Yehuda et al., 2019). Se sabe que los estímulos externos son capaces de incidir alteraciones fisiológicas durante el desarrollo embrionario, que incluye a los periodos prey postnatales, y manifestarse en un amplio rango de psicopatologías, que inclusive pueden preservarse hasta la etapa adulta (Barazzoni et al., 2015; Breier et al., 2001; Chang et al., 2008; Gueye et al., 2018; Vendruscolo et al., 2010; Vickers et al., 2000). De acuerdo a esto, mujeres obesas, o bien, mujeres embarazadas que incrementan el consumo de alimentos ricos en energía, muestran un aumento del aporte energético en el útero afectando el desarrollo embrionario del feto, un proceso conocido como programación fetal (Peleg-Raibstein et al., 2012). Varios estudios han documentado la presencia de ansiedad en la descendencia expuesta prenatalmente a una dieta alta en grasas en modelos murinos (Peleg-Raibstein et al., 2012; Sasaki et al., 2014; Winther et al., 2018). Recientemente, nuestro grupo documentó que la exposición a dieta de cafetería (dieta con alto porcentaje de grasa y azúcar) reduce la motivación por las recompensas naturales en la descendencia de ratas (Trujillo-Villarreal et al., 2021). Los mecanismos, por los cuales la obesidad materna y/o el exceso de nutrientes en el útero promueven un mayor riesgo de futuros trastornos psiquiátricos en su descendencia, se están estudiando, pero probablemente incluyen cambios en el suministro de nutrientes fetales en combinación con mecanismos genéticos y epigenéticos (Heerwagen et al., 2010).

Los procesos neurobiológicos de los trastornos depresivos y ansiosos no se conocen completamente, y carecemos de un conocimiento detallado de su etiología. Ciertamente, la depresión y ansiedad es una condición compleja y heterogénea, cuya neurobiología se ha asociado, en parte, a la presencia de cambios estructurales y funcionales en regiones selectivas del sistema nervioso central (SNC). Por ejemplo, los estudios de neuroimagen funcional y estructural han identificado alteraciones principalmente disfunción de conectoma cerebral en tálamo y habénula lateral en pacientes con depresión subclínica (Y. Zhu et al., 2019), y decremento de volumen del hipocampo (Marsden, 2013; Santos et al., 2018; Schoenfeld et al., 2017; van Velzen et al., 2020) y corteza prefrontal (Santos et al., 2018; Schmaal et al., 2016) en pacientes con depresión mayor (Lener et al., 2016). Además, niños con comorbilidad de síntomas depresivos y de ansiedad mostraron menor volumen cerebral en regiones de la corteza prefrontal, incluidas la ventromedial y la orbitofrontal asociados e hipocampo a mayores niveles de depresión y ansiedad en comparación con niños sanos (Merz et al., 2018), y menor volumen de la amígdala en jóvenes con ansiedad (Mueller et al., 2013; Strawn et al., 2015). Contrariamente, algunos otros estudios han reportado mayores volúmenes de la amígdala en jóvenes cona ansiedad (De Bellis et al., 2000). A la fecha, se desconoce como las alteraciones estructurales inducen los cambios funcionales en el cerebro relacionados con el trastorno de depresión y/o ansiedad. En este contexto, un conocimiento más detallado de los mecanismos fisiológicos que susceptibilizan al individuo a presentar cambios en la estructura cerebral podrían enriquecer la neurobiología del trastorno de depresión y/o ansiedad y proponer nuevas alternativas de diagnóstico y prevención.

Finalmente, se desconocen a la fecha los efectos de la programación fetal por exposición a nutrientes con alto porcentaje de energía sobre la estructura cerebral relacionadas a conductas ansiosas o depresivas en la decendencia y su potencial transmisión a generaciones posteriores a través de herencia transgeneracional. Aunque aún se encuentra en investigación, nuestro grupo documentó que la exposición prenatal a dieta de cafetería induce reducción del volumen de PFC, hipocampo y núcleo accumbens de la descendencia de sujetos que muestran decremento en la motivación por las recompensas naturales (Trujillo-Villarreal et al., 2021). Estos antecedentes proponen que la programación fetal por exposición a dieta con alto contenido energético podría favorecer cambios en la estructura cerebral incrementando la vulnerabilidad a desarrollar depresión/ansiedad en la descendencia.

En este trabajo de tesis se caracterizó en un modelo animal de ratas Wistar si la descendencia de madres expuestas a una dieta con alto contenido energético durante el embarazo y lactancia exhibía, conducta similar a la depresión y/o ansiedad que correlaciona con alteraciones en la estructura cerebral de la descendencia F1, y si tales cambios se transmiten a las generaciones F2 y F3 por herencia transgeneracional.

#### **CAPITULO 2**

#### ANTECEDENTES

#### 2.1 Trastornos del estado de ánimo

Los trastornos del estado de ánimo son enfermedades psiquiátricas comunes e incapacitantes que afectan a los individuos mundialmente y causan un gran impacto negativo en la salud pública (Yksel & Öngür, 2010). Desde una perspectiva clínica y de atención médica, los trastornos de ansiedad se encuentran entre las afecciones más frecuentes y costosas de todos los trastornos mentales (Bandelow & Michaelis, 2015). Esta problemática motiva una emergencia a comprender los mecanismos fisiológicos asociados a su evolución, con la finalidad de desarrollar tratamientos más efectivos. A pesar de los avances en la investigación preclínica y clínica en los últimos años, la etiología de la mayoría de los trastornos psiquiátricos sigue siendo desconocida.

El diagnóstico de los trastornos psiquiátricos es uno de los pilares fundamentales en la medicina personalizada. Sin embargo, la caracterización de la personalidad de un individuo es un gran reto en la práctica clínica. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de la ansiedad y depresión considerados dos entidades distintas, sin embargo, pueden ser mutuamente dependientes para el desarrollo de la patología. Según los criterios diagnósticos (American Psychiatric Association, 2013b), la depresión ansiosa (ansiedad y depresión comórbidas) es un síndrome relativamente común (Andreescu & Lee, 2020; Craske & Stein, 2016; World Health Organization, 2017). Se ha considerado que el 45-67% de los pacientes con trastorno depresivo mayor (TDM) cumplen los criterios de al menos un trastorno de ansiedad comórbido (Fried & Nesse, 2015; Kessler et al., 2003). De manera similar, el 30-63% de los pacientes con trastorno de ansiedad cumplen los criterios de TDM concurrente (Brown et al., 2001; Lamers et al., 2011). Sin embargo, se sabe que los sujetos con depresión ansiosa tienen diferentes perfiles neurobiológicos en comparación con aquellos con depresión no ansiosa. Incluso, varios estudios han revelado diferencias significativas entre la depresión ansiosa y la depresión no ansiosa con respecto a hallazgos de las imágenes cerebrales estructurales y funcionales (Andreescu & Lee, 2020; Brown et al., 2001; Life et al., 2017). De acuerdo a esta información, en esta tesis definiremos a la ansiedad y depresión como conductas psiquiátricas individuales, pero es importante recordar que ambas pueden llegar a ser incluidas en una misma etapa de vida del individuo.

#### 2.1.1 Ansiedad

Por definición, la ansiedad es un estado fisiológico de mayor vigilancia y capacidad de respuesta que da como resultado una gran variedad de comportamientos defensivos. Estos comportamientos sirven para prevenir o reducir el daño al organismo ante situaciones inesperadas y potencialmente peligrosas, por lo que la ansiedad es ante todo un mecanismo fisiológico adaptativo, fundamental para la supervivencia (Tovote et al., 2015). Los trastornos de ansiedad son el grupo de trastornos del estado de ánimo de mayor prevalencia dentro de las condiciones de salud mental a nivel mundial y son significativamente asociadas con comorbilidades y morbilidades (Craske & Stein, 2016; Stein et al., 2017). Estos trastornos de ansiedad (trastorno de ansiedad por separación, mutismo selectivo, fobias específicas, trastorno de ansiedad social o SAD, trastorno de

pánico, agorafobia y trastorno de ansiedad generalizada o GAD) son afecciones comunes y discapacitantes que comienzan principalmente durante la infancia, la adolescencia y la edad adulta temprana (American Psychiatric Association, 2013b; Craske & Stein, 2016). A menudo coexisten con depresión mayor, trastornos por consumo de alcohol y otras sustancias y trastornos de la personalidad (Andreescu & Lee, 2020). La quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales 5 (DSM-V), resume las presentaciones clínicas, signos y síntomas esenciales de los individuos con trastornos de ansiedad, los cuales son excesivamente temerosos, ansiosos o evitan las amenazas percibidas en el entorno (p. Ej., situaciones sociales o lugares desconocidos) o internas a uno mismo (p. Ej., sensaciones corporales inusuales) (American Psychiatric Association, 2013b). Adicional a la carga emocional del miedo y la aprensión excesivos, los trastornos de ansiedad exhiben deterioro de la función del cuerpo debido a que los individuos se abstienen de participar en actividades de inclusión social, así como síntomas físicos, como problemas respiratorios, gastrointestinales y cardiovasculares (Babaev et al., 2018). Los trastornos de ansiedad subyacentes son marcados como agorafobia (si el miedo es la incapacidad o no poder escapar de tales situaciones), el trastorno de ansiedad social (si el miedo es el escrutinio y la evaluación de otros en tales situaciones), el trastorno de pánico (si el miedo es de ataques de pánico), trastorno de ansiedad por separación (si el miedo es a la separación de una figura de apego) o fobia específica (por ejemplo, si el miedo es a los ascensores) (American Psychiatric Association, 2013b; Craske & Stein, 2016; Ströhle et al., 2018).

#### 2.1.1.2 Neurobiología de los trastornos de ansiedad

A hace poco más de un siglo del descubrimiento original de que las estructuras del lóbulo temporal gobiernan los comportamientos emocionales ("XI. An Investigation into the Functions of the Occipital and Temporal Lobes of the Monkey's Brain," 1888), nuestra comprensión de los sustratos neurales de la ansiedad se restringió en gran medida a los conocimientos obtenidos a través de estudios de lesiones cerebrales dirigidas y/o de la inactivación selectiva de la función cerebral. Este importante trabajo inicial condujo a la identificación de regiones clave que controlan la ansiedad, que incluyen a la amígdala, el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el hipocampo ventral (vHPC) y la corteza prefrontal (PFC) (Fig. 1). Se ha confirmado que la activación de las distintas áreas de la amígdala son dependientes del tipo de ansiedad o estresor que estimule. Por ejemplo, dentro de este macrocircuito, la activación de las neuronas en la amígdala basolateral (BLA) induce una parálisis por miedo no condicionado (Johansen et al., 2010). Por otro lado, la presencia de una amenaza, como un golpe en el pie, da como resultado respuestas rápidas de miedo al activar microcircuitos en la amígdala central (CeA) (H. Li et al., 2013). También se ha demostrado que la activación de neuronas en la amígdala lateral (CeL), quienes son positivas para somatostatina (SOM), por la amígdala lateral (H. Li et al., 2013) y el núcleo paraventricular del tálamo impulsan el aprendizaje del miedo a través de un aumento general de la inhibición de la CeL (Penzo et al., 2014). Además, una población de células en el BLA que se proyecta directamente en la amígdala centromedial (CeM) muestra evidencia de potenciación después del condicionamiento del miedo, y la fotoinhibición de estas neuronas inhibe la adquisición de la asociación del miedo (Fig. 1) (Namburi et al., 2015). A pesar de este avance en la neurobiología cerebral de la ansiedad, la importancia de los microcircuitos regionales que contribuyen a la patología emocional en los humanos sigue siendo limitado (Calhoon & Tye, 2015).



**Figura 1.** Circuitos neuronales implicados en comportamientos relacionados con la ansiedad en el cerebro de roedores. Una vista sagital del cerebro de un roedor, incluidos los circuitos distales implicados en los comportamientos relacionados con la ansiedad. Ad, núcleo anterodorsal del BNST; AHA, área hipotalámica anterior; BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CeA, amígdala central; CeL, subdivisión lateral de la amígdala central; CeM, subdivisión centromedial de la amígdala; CRFR2a, receptor del factor liberador de corticotropina tipo 2; DR, núcleo del rafe dorsal; CVD, complejo vagal dorsal; HPC, hipocampo; Hip, hipotálamo; IL, división infralímbica de la mPFC; LC, locus coeruleus; LH, hipotálamo lateral; LS, tabique lateral; mPFC, corteza prefrontal medial; Nac, núcleo accumbens; ov, núcleo oval del BNST; PAG, gris periacueductal; PB, núcleo parabraquial; PL, división prelímbica de la mPFC; VTH, núcleo paraventricular del hipotálamo; PVT, tálamo paraventricular; SI sustancia innominada; Thal, tálamo; v, núcleo ventral del BNST; vHPC, hipocampo ventral; VTA, área tegmentaria ventral. (Calhoon & Tye, 2015).

El avance en la aplicación de nuevas tecnologías y enfoques modernos en el área de la neurociencia han contribuido a desenmascarar los neurocircuitos cerebrales implicados en los trastornos emocionales. Los enfoques innovadores en la investigación con animales, especialmente las manipulaciones dirigidas de las neuronas basadas en el objetivo de proyección o la identidad genética a través de la optogenética, han acelerado el ritmo del descubrimiento. Además, en la parte clínica el desarrollo de herramientas de neuroimagen como la tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (MRI) y la tomografía por emisión de positrones (PET) favoreció la capacidad de investigar de forma no invasiva los cerebros de individuos con trastornos psiquiátricos, así como la posibilidad de identificar firmas patológicas de estos trastornos. En particular, los estudios de imagen de resonancia magnética (MRI) estructural y funcional han identificado diversas estructuras cerebrales profundamente involucradas en la regulación de las emociones o el procesamiento de recompensas.

Los análisis por MRI han documentado alteraciones funcionales y estructurales en la amígdala de los sujetos ansiosos, las cuales proporcionan marcadores selectivos para el diagnóstico inicial del sujeto (Andreescu & Lee, 2020; J. Chen et al., 2019; Jayakar et al., 2020; McIlwrath et al., 2020). Además, estudios de resonancia magnética de imagen funcional con tarea (fMRI task), han propuesto que una mayor conectividad entre la amígdala y la corteza cingulada anterior (ACC) predispone a los sujetos ansiosos a centrarse en la atención relacionada con la amenaza ambiental (Abrams et al., 2013; Carlson et al., 2013). Dentro de un estado de ansiedad, las hiperrespuestas de la amígdala son una fuente de síntomas de ansiedad y están vinculadas de manera aberrante con las regiones frontales y corticales que favorecen deterioros de las funciones cognitivas (Dresler et al., 2013). Además, un estudio de la tarea de regulación emocional explícita en pacientes con GAD, mostraron una capacidad reducida para la regulación de las emociones en regiones cerebrales, como el ACC, la amígdala y la corteza prefrontal medial. Estos datos confirman la implicación del circuito fronto-límbico en la patofisiología de GAD (Blair et al., 2012). Específicamente, diferentes percepciones de amenazas activan diferentes partes de las regiones cerebrales. Por ejemplo, una amenaza interna podría activar las respuestas del ACC, la ínsula y la Corteza orbitofrontal; mientras que la amenaza externa podría estar asociada con hiperactividad en la corteza cingulada posterior y la circunvolución temporal media (Choi et al., 2016).

Un estudio de la terapia cognitivo-conductual en pacientes con GAD mostró que la terapia atenúa las respuestas de la amígdala y aumenta la actividad de las regiones frontales en una tarea de procesamiento facial afectivo (Månsson et al., 2013), lo cual confirma la participación del circuito fronto-límbico en la tarea de red cerebral basada en resonancia magnética para GAD. Otro estudio de la tarea de rostro neutral desatendido en SAD también demostró una posible diferenciación de los controles sanos en la conectividad funcional entre el polo temporal y el hipocampo (Pantazatos et al., 2014), lo que sugiere de igual manera una alteración de la red intra-límbica en GAD. Además, en un estudio en humanos por fMRI, pacientes con GAD como con SAD tenían activaciones significativamente reducidas en la corteza prefrontal dorsolateral durante la tarea de memoria de trabajo, sugiriendo que la ansiedad clínica puede estar asociada con déficits cognitivos asociado a un bajo desempeño en la ejecución de tareas (Balderston et al., 2017).

Para una mejor comprensión de la neurobiología de los trastornos como la ansiedad, los estudios basados en MRI incluyen la posibilidad del estudio de la macroestructural (anatómicas) y microestructura cerebral (imágenes con tensor de difusión). Existe evidencia de que GAD se caracteriza por cambios anatómicos significativos en el cerebro, particularmente en las regiones relacionadas con los neurocircuitos de ansiedad antes mencionadas. Por ejemplo, el aumento del volumen de sustancia gris (GM) en la amígdala se ha encontrado como potencial marcador de alteraciones en la estructura cerebral en pacientes con GAD (Etkin et al., 2009). En particular, el aumento del volumen de la amígdala derecha en los pacientes con GAD, se ha asociado con tiempos de reacción prolongados en la tarea de seguimiento, indicando un deterioro de la atención (Makovac et al., 2016). Además, existe una correlación positiva entre la gravedad de los síntomas ansiosos con los volúmenes de la corteza prefrontal dorsomedial y la ACC en los pacientes con GAD (Schienle et al., 2011). En contraste, un estudio de resonancia magnética reporta un aumento de volumen de GM en el putamen derecho en pacientes adolescentes con GAD comparado con sujetos sanos (M. Liao et al., 2014). Un estudio en adolescentes sin medicación que padecían GAD sin comorbilidades, reportan un aumento de los volúmenes de GM en el precuneus derecho y en la circunvolución precentral derecha y una disminución de volumen GM en la circonvolución orbital izquierda y en el cingulete posterior, comparado con adolescentes sanos (Strawn et al., 2013).

Los estudios sobre anomalías en la estructura cerebral en la ansiedad, también incluyen cambios microestructurales. Reportes confirman alteraciones microestructurales en los tractos de sustancia blanca empleando imágenes de tensor de difusión (DTI). En estos estudios se emplean parámetros DTI como la anisotropía fraccional (FA), la difusividad media (MD), la difusividad radial (RD) y la difusividad axial (AD) que reflejan la degeneración axonal, la desmielinización, la maduración de la sustancia blanca y la densidad de empaquetamiento axonal. Además, se han reportado que pacientes adultos y adolescentes con GAD muestran una menor anisotropía fraccionada (FA) en el fascículo uncinado y FA más alta en la sustancia blanca (WM) de la amígdala derecha y FA más baja en la WM cingulada anterior en comparación con los controles sanos (Hettema et al., 2012). La carencia de FA del fascículo uncinado sugiere un deterioro en los tractos nerviosos que realizan la conexión entre la corteza prefrontal y las estructuras límbicas (Ebeling & Cramon, 1992). Las anomalías de FA concuerdan con los estudios de neuroimagen en sujetos con GAD que describen anomalías en la conectividad entre las estructuras límbicas y frontales. Lo que sugiere que dichas alteraciones pueden estar relacionadas con la predisposición a presentar GAD. Sin embargo, los causantes neurobiológicos que pudieran dar a estas alteraciones cerebrales se desconocen.

#### 2.1.1.3 La ansiedad y la amígdala

Si bien el procesamiento de la información relacionada con la ansiedad involucra una amplia gama de regiones del cerebro (Tovote et al., 2015), como se describió anteriormente, una estructura clave en este circuito es la amígdala. Está región cerebral se ha descrito que contribuye al mantenimiento del dolor neuropático crónico y ansiedad (McIlwrath et al., 2020). Las lesiones de la amígdala en humanos, monos y roedores resultan en una incapacidad para reconocer estímulos temerosos, y la estimulación eléctrica de la amígdala en humanos genera sentimientos de miedo y ansiedad (Janak & Tye, 2015). Además, se ha observado hiperexcitabilidad de la amígdala en respuesta a estímulos de carga negativa en pacientes con varios tipos de trastornos de ansiedad, y esto se revierte posterior al tratamiento exitoso con terapia cognitiva conductual (Barbara Ferry., 2012).

La amígdala consta de múltiples subdivisiones, de las cuales la amígdala basolateral (BLA) y la amígdala central (CeA) son particularmente importantes en el procesamiento de la ansiedad. El BLA recibe información sensorial del tálamo, las áreas de asociación cortical y la corteza prefrontal (PFC) a través del núcleo lateral (LA), procesa esta información en el núcleo basal (BA) y la envía a la subdivisión lateral del CeA. Paralelamente, las entradas del BLA excitan directamente la subdivisión medial del CeA (amígdala centromedial, CeM). En respuesta a la excitación por parte de BLA, las neuronas de proyección de CeL y CeM se dirigen y regulan múltiples regiones implicadas en la ansiedad, incluida la sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el hipotálamo y el complejo vagal dorsal (DVC), para dar lugar a respuestas autonómicas y motoras. Por lo tanto, la salida excitatoria del BLA al CeA se traduce en una reacción conductual a los estímulos aversivos, incluida la evitación.



**Figura 2**. Circuitos inhibitorios de la amígdala que están implicados en la regulación del comportamiento relacionado con la ansiedad. La información sensorial de la corteza y el tálamo fluye en serie a través del BLA y se bifurca cuando ingresa al CeA. Para simplificar, se omiten todos los aferentes del CeA aparte de los aferentes BLA, así como algunos de los objetivos río abajo del CeA, incluido el complejo vagal dorsal y el hipotálamo (que recibe información del CeM). Abreviaturas: amígdala basolateral BLA; calbindina CALB; colecistoquinina grande LCCK; colecistoquinina pequeña SCCK; CeA amígdala central; amígdala centrolateral CeL; amígdala centromedial CeM; factor liberador de corticotropina CRF; dPAG gris periacueductal dorsal; receptor de serotonina HTR2A 2 A; HYP, hipotálamo LC, locus coeruleus; receptor de neuroquinina 1 NK1R; OTR, receptor de oxitocina; gris periacueductal PAG; parvalbúmina PV; somatostatina MOS; taquiquinina 2 Tac2; péptido intestinal vasoactivo VIP; receptor de vasopresina VPR.

#### 2.1.1.4 Estudio de los trastornos de ansiedad en modelos animales.

La asistencia de los modelos preclínicos ha impulsado la identificación y caracterización de los circuitos neuronales que regulan la ansiedad. Si bien es imposible conocer con certeza la experiencia subjetiva de un roedor, los circuitos límbicos se encuentran bien conservados en los modelos murinos, por lo que su empleo es la investigación preclínica es una poderosa herramienta de investigación neuropsiquiátrica.

Los estudios en animales suelen utilizar formas de estrés, un factor etiológico bien aceptado en la depresión y ansiedad, para estudiar los correlatos neurobiológicos del comportamiento depresivo ansioso.

Existe una gran variedad de paradigmas de comportamiento para evaluar los comportamientos relacionados con la ansiedad en roedores, cuyo objetivo es proporcionar una comparación significativa con al menos un aspecto de la experiencia humana. Las pruebas validadas incluyen la evaluación de evitación activa, hiponeofagia, interacciones sociales y respuestas emocionales condicionadas (CER), así como pruebas etológicas que investigan el conflicto de aproximación-evitación, como el laberinto en cruz elevado (EPM), campo abierto (OF), caja luz-oscuridad (LDB)(Calhoon & Tye, 2015). Las pruebas de aproximación-evitación, que se utilizan ampliamente para evaluar la ansiedad en modelos animales genéticos y ambientales debido a su naturaleza etológica, se basan en el conflicto entre explorar un entorno nuevo y evitar una situación potencialmente peligrosa (como un entorno en el que el riesgo de ser detectado por un depredador es alto). Las pruebas consisten en dejar que los animales exploren libremente un ambiente que ofrece una zona 'segura' y otra 'peligrosa' (brazos amurallados versus brazos abiertos del EPM, bordes versus el centro del OF, compartimentos oscuros versus claros del LDB (Cryan & Sweeney, 2011). Los ratones con un fenotipo ansioso tienden a explorar menos y evitan las áreas expuestas y muy iluminadas, mostrando una evitación excesiva de amenazas potenciales que es similar a los síntomas de ansiedad en humanos (Calhoon & Tye, 2015).

Adicionalmente, se ha estudiado el trastorno de ansiedad y depresión en modelos estándar de animales por estrés crónico, por ejemplo, estrés crónico leve (CMS) y estrés

crónico impredecible (CUS), en donde el primero se basa en un programa de estresores leves y en el segundo consiste en una serie de factores estresantes impredecibles durante varias semanas. Estos modelos sugieren reproducir las mejores representaciones de la depresión humana comparado con los modelos de estrés agudo (Marsden, 2013). En los modelos de roedores, el estrés crónico se usa a menudo como un modelo de depresión y ansiedad, ya que conduce a conductas de tipo depresivo que incluyen la indefensión aprendida, la anhedonia y el aislamiento social. El estrés crónico y la administración de corticosterona en roedores también reducen el volumen del hipocampo, aunque el momento, la ubicación y la magnitud de los efectos son variables y, en algunos casos, indetectables (Jayatissa et al., 2010; Xi et al., 2011). Se piensa que los cambios en el volumen cerebral pueden estar relacionados con alteraciones celulares que podrían contribuir a la pérdida de volumen, incluida la pérdida de longitud dendrítica o espinas dendríticas, neurogénesis más lenta, disminución del tamaño o número glial y constricción del espacio extracelular. La atrofia dendrítica de células piramidales CA3 se observa en ratas después del tratamiento con estrés crónico o glucocorticoides y se ha relacionado con un comportamiento depresivo (Schoenfeld et al., 2017). La generación de nuevas neuronas granulares del giro dentado (DG) también puede ser inhibida por el estrés y la corticosterona, aunque los efectos del estrés crónico en la neurogénesis adulta son complejos y no se comprenden completamente. El impacto del estrés en la neurogénesis adulta es de particular interés porque la inhibición de la neurogénesis adulta influye en el comportamiento de tipo ansio-represivo inducido por el estrés en roedores y se sugiere que también desempeña un papel en la depresión en humano (Schoenfeld et al., 2017).

#### 2.1.2 Depresión

El diagnóstico de los trastornos depresivos incluye a la anhedonia. La anhedonia, o pérdida de interés o placer, es un síntoma característico de muchos trastornos neuropsiquiátricos, principalmente el trastorno depresivo mayor (TDM) (Der-Avakian & Markou, 2012). Durante la anhedonia se presenta déficit del sistema de la recompensa (Whitton et al., 2016), en donde existe un decremento en la motivación para buscar experiencias placenteras y la falta de decisiones apropiadas (American Psychiatric Association, 2013b). En la mayoría de los casos, la presencia de anhedonia es un punto de inicio para el desarrollo de depresión, sin embargo, la anhedonia también se encuentra incluida en la lista de síntomas de otros trastornos como en esquizofrenia, en gran parte debido a que tanto en la depresión, como en la anhedonia o la esquizofrenia integran los mismos circuitos de activación cerebral (Lambert et al., 2018). Como ejemplo, el diagnóstico de TDM se caracteriza por la presencia de al menos cinco de nueve criterios, de los cuales la anhedonia es un criterio central de diagnóstico (American Psychiatric Association, 2013b). Además de tener un estado de ánimo depresivo o anhedonia, el paciente también debe presentar cuatro de los siguientes síntomas: (1) disminución o aumento significativo del peso corporal o del apetito; (2) insomnio o hipersomnia; (3) enlentecimiento psicomotor o agitación; (4) fatiga o pérdida de energía; (5) sentimientos de inutilidad o culpa excesiva; (6) dificultad para pensar o concentrarse, o indecisión; y (7) pensamientos recurrentes de muerte o ideación suicida (American Psychiatric Association, 2013a; Hoffman, 2016). Como resultado, hay más de 200 combinaciones de criterios potenciales que pueden cumplir un diagnóstico.

Los pacientes con TDM que presentan síntomas anhedónicos pueden demostrar disociación entre el placer vivido y la motivación, la expectativa de resultados negativos independientemente de los resultados positivos previos y una mayor prevención del riesgo a desarrollarlos (Lambert et al., 2018). Por su parte, también se ha identificado que la anhedonia es un síntoma residual prominente después del tratamiento. Según la American Psychiatric Association (American Psychiatric Association, 2013b), los trastornos mentales de mayor prevalencia son los del estado de ánimo depresivo y los de ansiedad; la depresión se ha reportado con valores del 10 % al 25 % para las mujeres y del 5 % al 12 % para los hombres, y la ansiedad con porcentajes entre el 3 % al 5 % de la población general. En México, el 29.9 % de integrantes del hogar de 12 años y más, han tenido episodios con diagnóstico de depresión. Además, de estos integrantes, 10.5 % lo presenta diariamente, 12.4 % semanalmente, 11.6 % mensualmente y un 65.5% anualmente (INEGI, 2015). En este concepto, la depresión en la población mundial se ubica en más de 300 millones de personas afectadas, en donde las mujeres muestran mayor prevalencia que los hombres. Especialmente cuando es de larga duración y con intensidad moderada o severa, la depresión puede convertirse en una condición de salud seria que puede llevar al suicidio. De hecho, se estima que alrededor de 800 000 personas mueren debido al suicidio cada año, siendo la principal causa de muerte en personas de 15 a 29 años (WHO, 2018). Además, puede ser causa de enfermedades letales tales como enfermedades cardiacas, trastornos cerebrovasculares, y otras causas de mortalidad (Duman et al., 2016).

#### 2.1.2.1 Neurobiología de la depresión

La tecnología de neuroimagen como la resonancia magnética funcional (fMRI) han revolucionado el estudio de los trastornos neuropsiquiátricos, haciendo posible visualizar los correlatos fisiológicos y anatómicos de la actividad y función del cerebro humano. Estas técnicas han sido invaluables para hacer preguntas enfocadas sobre la actividad de regiones cerebrales específicas durante condiciones de reposo, así como durante la realización de tareas cognitivas o motoras específicas, tanto en sujetos sanos como en pacientes con trastornos neuropsiquiátricos (Hoffman, 2016). Evidencias neuropsicológica han reportado deficiencias en la función ejecutiva, la memoria y el procesamiento emocional en pacientes con depresión (Gotlib & Joormann, 2010). Los estudios de neuroimagen demuestran que estas deficiencias se acompañan de anomalías funcionales y estructurales focales en muchas regiones (Drevets et al., 2008; "Limbic-Cortical Dysregulation: A Proposed Model of Depression," 1997; Wise et al., 2017; Zhao et al., 2017), incluido el hipocampo (Bach et al., 2019; Yvette I. Sheline, 2011), la corteza prefrontal medial (Drevets et al., 2008), la corteza prefrontal dorsolateral (Fitzgerald et al., 2006), corteza cingulada anterior (ACC) (Coloigner et al., 2019; Der-Avakian & Markou, 2012), corteza cingulada posterior / precuneus (PCC / Pcu) (Mah et al., 2007), amígdala (Abrams et al., 2013; Kanner, 2004; Mah et al., 2007) y núcleo caudado (Kim et al., 2008; Krishnan, 1992). Además, estudios de fMRI han reportado asociaciones anormales entre regiones, que involucran el circuito de modo predeterminado (DMN) (Frodl et al., 2010; Liu et al., 2018; Y. I. Sheline et al., 2010; X. Zhu et al., 2012), ACCtálamo (Anand et al., 2009), ACC-ínsula (Connolly et al., 2013) y prefrontal-límbicotálamo (Lui et al., 2011), la covarianza estructural entre las regiones prefrontales (Qiu et al., 2014) y conectividad anatómica en el fascículo longitudinal inferior, fascículo frontooccipital inferior, radiación talámica posterior y cuerpo calloso (Bae et al., 2006; Y. Liao et al., 2013), lo que sugiere que la depresión implica alteraciones de la conectividad cerebral en múltiples circuitos neuronales.

Varios estudios de fMRI en estado de reposo han reportado una organización topológica aberrante de las redes funcionales de todo el cerebro en pacientes depresivos adultos. Zhang et al. (J. Zhang et al., 2011) midieron los coeficientes de correlación de las señales de fMRI en estado en reposo entre 90 regiones corticales y subcorticales en pacientes depresivos sin tratamiento previo con un primer episodio. Los pacientes con depresión mostraron una disminución de la conectividad regional (grado, eficiencia e intermediación) en las regiones de DLPFC y occipital. La DLPFC se involucra en la regulación emocional y función cognitiva (Balderston et al., 2017; Pathak et al., 2016; Steele & Lawrie, 2004) y está implicada en la patofisiología de la depresión. Además, los pacientes deprimidos también mostraron una mayor conectividad nodal en el putamen y este aumento se correlacionó positivamente con el número de episodios depresivos, independientemente de los síntomas actuales, el estado de la medicación y la duración de la enfermedad (C. Meng et al., 2014). Por otro lado, estudios de la estructura cerebral por MRI han reportado reducción de volumen de sustancia gris en regiones cerebrales donde se incluyen la amígdala (Kanner, 2004; Koolschijn et al., 2009), hipocampo (Campbell et al., 2004), putamen (Koolschijn et al., 2009), núcleo caudado (Videbech, 2004) y la corteza somatosensorial (Coryell et al., 2005).

Adicionalmente, estudios de neuroimagen estructural han documentado cambios profundos en la estructura cerebral de sujetos con depresión. En un metanálisis de Wise
et al. En donde se incluyó la resonancia estructural de 4101 personas con depresión reportaron la reducción de volumen en las circunvoluciones frontales inferior y media (que se refieren a vIPFC y dIPFC, respectivamente), vmPFC, PCC, ACC dorsal, ínsula, hipocampo, circunvolución parahipocampal y núcleo caudado, pero un aumento del volumen de la circunvolución occipital superior y cuneus en pacientes con depresión (Wise et al., 2017). Adicionalmente, un segundo metanálisis de Chen et al. Usando 14 estudios de DTI con 399 pacientes con primer episodio de depresión, pacientes sin tratamiento previo con fármacos y 396 controles sanos, se encontró una FA reducida en el cuerpo del cuerpo calloso, el brazo anterior bilateral de la cápsula interna, la circunvolución temporal inferior derecha y la circunvolución frontal superior derecha en pacientes con TDM. También se identificó que la gravedad de la depresión y la duración de la enfermedad se correlacionaron negativamente con los valores de FA en el brazo anterior derecho de la cápsula interna y la circunvolución frontal superior derecha, respectivamente (G. Chen et al., 2017). Estos estudios fortalecen la evidencia de la posibilidad de que la anisotropía fraccional disminuida pueda afectar la conectividad del circuito prefrontal dorsolateral y el circuito cingulado anterior, lo que resulta en la desconexión de las estructuras corticales y subcorticales en la depresión (Benjamin & Steffens, 2011). Además, la disminución de la integridad de los tractos de materia blanca también se asocia con una función ejecutiva disminuida, que se observa comúnmente en la depresión.

#### 2.1.1.4 Estudio de los trastornos de depresión en modelos animales

En relación a lo comentado anteriormente para los modelos animales empleados en la investigación del trastorno de ansiedad, los modelos preclínicos también han sido útiles para la investigación neurobiológica de la depresión. Aunque como comentamos anteriormente, algunos de los modelos animales empleados para similar la depresión suele incluir a la ansiedad como una segunda alteración conductual. En particular, los acontecimientos vitales estresantes y el estrés crónico se consideran factores significativos en la inducción de la depresión, y se han diseñado varios modelos animales de este trastorno basados en esta relación etiológica (Hoffman, 2016). Para ello, diferentes estudios preclínicos han utilizado procedimientos en roedores, donde las pruebas conductuales más comúnmente utilizados para este comportamiento en roedores son las pruebas de suspensión de cola y nado forzado, en las que se evalúa la impotencia aprendida, reflejando un estado depresivo (Belovicova et al., 2017; Der-Avakian & Markou, 2012; Jiang et al., 2018). De hecho, el modelo de depresión lo han caracterizado con una conducta pasiva frente a situaciones ineludibles como lo es un nado forzado (Gueye et al., 2018; Seewoo et al., 2020). De estos estudios, han encontrado decremento de numero de células nuevas en el hipocampo en modelo depresivo inducido por consumo de sacarosa (Gueye et al., 2018). Además, se han reportado una disminución del volumen en hipocampo (Gigliucci et al., 2014) que se han asociado a disminución de tamaño celular en áreas como CA1 en modelos de rata de depresión inducidas por estrés (Y. Li et al., 2017; Macedo et al., 2015).

# 2.1.2.2 Mecanismos neurofisiológicos que contribuyen a los cambios en la estructura cerebral

Aunque aún en investigación, se propone que la inflamación cerebral puede afectar la estructura del cerebro y favorecer cambios en la conducta. De hecho, existen estudios que investigan el impacto de una variedad de estímulos inflamatorios en el cerebro y el comportamiento con evidencias de que la inflamación y la liberación de citocinas inflamatorias al cerebro afectan los circuitos relevantes para la sensibilidad a un cambio de comportamiento (Jennifer C Felger & Treadway, 2017; Miller et al., 2013; C L Raison & Miller, 2013). De hecho, se ha demostrado que las citocinas afectan los ganglios basales y los circuitos motores y de recompensa corticales, así como también afectan las estructuras relacionadas con el miedo y la ansiedad, incluida la amígdala, la ínsula y la corteza cingulada anterior (ACC) (Miller et al., 2013; C L Raison & Miller, 2013). Está bien establecido que una proporción significativa de pacientes con trastornos relacionados con el estado de ánimo y la ansiedad muestran evidencia de marcadores inflamatorios elevados, incluidos aumentos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y concentraciones circulantes de citocinas inflamatorias, quimiocinas y reactivos de fase aguda, cambios en la expresión génica y mayor presencia de fenotipos de células inmunitarias inflamatorias (Haroon et al., 2012; Michopoulos et al., 2017; Miller et al., 2013). Además, se ha documentado la correlación entre un perfil proinflamatorio y la depresión en comparación con controles, incluidos acumulación de citocinas inflamatorias factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina (IL)-1β, IL-6 y la fase aguda proteína C reactiva (PCR) (Capuron et al., 2012; Charles L. Raison et al., 2013). Se cree que las señales inflamatorias elaboradas en el sistema periférico impactan en el cerebro para generar síntomas conductuales relevantes para los trastornos relacionados con el estado de ánimo y la ansiedad (Jennifer C. Felger, 2018). Asimismo, la administración de la citocina inflamatoria interferón (IFN)- $\alpha$  a pacientes o la administración de vacuna contra la fiebre tifoidea o endotoxina a voluntarios sanos ha demostrado que la inflamación afecta los circuitos cerebrales corticales y subcorticales asociados con la motivación y la actividad motora, así como las regiones cerebrales corticales asociadas con excitación, ansiedad (J. C. Felger et al., 2016). De manera notable, pacientes con depresión que exhiben aumento en las concentraciones de CRP en sangre periférica se correlacionaron con disminuciones en la conectividad dentro de los circuitos de motivación y recompensa que involucran el cuerpo estriado ventral y la corteza prefrontal ventromedial (vmPFC), que a su vez se asociaron con anhedonia (Harrison et al., 2016).

Los estudios preclínicos han propuesto diversos mecanismos moleculares que asocian el efecto del incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias con las alteraciones en la estructura cerebral. Por ejemplo, niveles crónicamente elevados de citocinas proinflamatorias están asociados con alteración de la sinaptogénesis y activación microglial excesiva (Mirabella et al., 2021; Satrom et al., 2018) y puede alterar la integridad de la barrera hematoencefálica. De hecho, se ha reportado que una reacción inmune elevada puede dañar directa o indirectamente las células endoteliales microvasculares del cerebro (BMEC) y la unión estrecha intercelular que da lugar a la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) (Banks et al., 2015; Feng et al., 2018). Estos efectos se traducen en un entorno neurotóxico que conduce a una neurogénesis alterada, pérdida neuronal y, con el tiempo, pérdida de tejido cerebral.



**Figura 3**. Interacción entre depresión e inflamación: Una gran cantidad de datos respalda la hipótesis de que el sistema inmunitario en general y la inflamación en particular representan un camino hacia la patología en un número significativo de pacientes deprimidos(Five Things to Know About Inflammation and Depression, n.d.)

### 2.2 Sobrealimentación en México y el mundo

La sobrenutrición se define como el consumo excesivo de nutrientes y alimentos hasta el punto en que la salud se ve afectada negativamente, donde la ingesta excesiva de nutrientes puede conducir a la acumulación de grasa corporal y convertirse en obesidad, lo que aumenta el riesgo de enfermedades graves, como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer y diabetes tipo 2 (Chopra et al., 2002; The Partnership for Maternal, 2012). Por otro lado, la obesidad es una condición patológica que se asocia al desarrollo del desbalance energético en donde la ingesta de calorías excede las calorías que se consumen en forma de energía con la finalidad de mantener las condiciones basales del organismo (Torres & Nowson, 2007). Globalmente, la crisis de sobrenutrición y la obesidad, se han considerado una epidemia que ha ido en incremento en su prevalencia y severidad especialmente entre adolescentes y adultos jóvenes (Chopra et al., 2002; Laving et al., 2018; OMS, 2016). Por ejemplo, en el 2015 la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) reportó, que el 19,5% de la población adulta era obesa (OECD, 2017). En específico, durante el último decenio, la tasa de prevalencia de sobrepeso y obesidad ha aumentado en Canadá, Francia, México, Suiza y Estados Unidos, en donde México se ubica como el primer país con obesidad en niños y el segundo con obesidad en adultos (OECD, 2017).

### 2.3. Obesidad y trastornos emocionales

Un índice de masa corporal (IMC) elevado es predictivo de un curso crónico de síntomas depresivos y de ansiedad (Milaneschi et al., 2019). Las probabilidades de desarrollar un trastorno depresivo mayor (TDM) y ansiedad aumentan en función del número de trastornos metabólicos coexistentes, como los característicos del síndrome metabólico(Jokela et al., 2014). La obesidad está asociada a varios cambios estructurales y funcionales en el cerebro que son notablemente similares a los observados en los trastornos depresivos, como aumentos específicos de la región en la densidad celular y conectividad neuronal y excitabilidad comprometidas (Rapuano et al., 2020). Varias líneas de evidencia sugieren que la inflamación prolongada causada por un estilo de vida dietético deficiente y la inactividad física contribuyen a resultados negativos en la conducta cerebral. Las personas obesas que presentan inflamación sistémica elevada, en particular aumentos de la PCR, tienen más probabilidades se incluidos en criterios del síndrome metabólico y de desarrollar depresión y ansiedad (Fulton et al., 2022). Los estudios de neuroimagen de estos sujetos exhiben alteraciones estructurales que incluyen disminución de la materia gris cortical que son sorprendentemente comparables con las observadas en individuos con trastornos del estado de ánimo (Cazettes et al., 2011).

# 2.4 Programación fetal y su contribución al desarrollo de alteraciones conductuales

Según estudios publicados por el epidemiólogo David Barker, la prevalencia de algunas enfermedades en la edad adulta se correlaciona con la alteración homeostática durante la etapa fetal. Se propone que algunos insultos en fases principales del desarrollo, podrían promover cambios estructurales y funcionales en el feto, que posteriormente podrían conducir a una enfermedad a largo plazo. El concepto de programación fetal se basa en observaciones epidemiológicas y experimentales de asociaciones cercanas entre un entorno intrauterino adverso y la aparición posterior de trastornos metabólicos y conductuales en adultos. En específico, durante el embarazo algunas perturbaciones ambientales como son estrés, infecciones y cambios nutricionales, pueden predisponer al producto a presentar enfermedades selectivas (Chang et al., 2008). Este proceso se conoce como programación fetal (Barker, 1990; Godfrey & Barker, 2001). Se ha definido a la programación fetal como un proceso de adaptación a un ambiente intrauterino adverso que altera el entorno metabólico y hormonal fetal, lo que resulta en el restablecimiento de los procesos de desarrollo para garantizar la supervivencia del feto (Bale, 2015). Sin embargo, la descendencia programada desarrolla diversas patologías que incluyen, hiperfagia profunda, obesidad, hipertensión, hiperinsulinemia e hiperleptinemia durante la vida adulta y la nutrición hipercalórica posnatal amplifica las anomalías metabólicas y cardiovasculares inducidas por la programación fetal (Bale, 2015; Breier et al., 2001). De interés, la programación fetal por ingesta desmedida de alimento calórico materno también está vinculada al desarrollo de trastornos conductuales en la descendencia que incluyen adicción, ansiedad, autismo, depresión, entre otras (Cárdenas-Tueme et al., 2020; Cruz-Carrillo et al., 2020; Glover et al., 2018; Joaquim et al., 2017; Lindsay et al., 2018; Montalvo-Martínez et al., 2018; Rivera et al., 2015; Trujillo Villarreal et al., 2020).

Nuestro grupo de investigación y algunos otros, ha demostrado que los efectos negativos de la exposición a dieta con alto contenido energético durante el embarazo y lactancia se presentan en la descendencia inclusive a nivel del sistema nervioso central y pueden permanecer durante la etapa adulta posterior al nacimiento (Camacho, 2017; Maldonado-Ruiz et al., 2019; Segovia, Vickers, Gray, & Reynolds, 2014). Es ampliamente aceptado que el consumo de una dieta alta en grasa y el presentar obesidad promueven inflamación crónica inducida en varios tejidos, incluido el cerebro (Pistell et al., 2010). De interés, la obesidad materna puede favorecer el desarrollo de la inflamación en el cerebro de la descendencia a largo plazo (Bilbo & Tsang, 2010; McNaull, Todd, McGuinness, & Passmore, 2010; Shaftel, Griffin, & Kerry, 2008). Nosotros hemos reportado que la descendencia de madres alimentadas con dieta con alto contenido energético muestra inflamación en el hipotálamo (Maldonado-Ruiz et al., 2019).



**Figura 4.** Representación de la hipótesis de la programación fetal. Efectos interactivos de la nutrición prenatal y el estrés en la programación fetal del cerebro de la descendencia y los resultados del desarrollo neurológico. (Lindsay et al., 2018)

De manera sobresaliente, experimentos en modelos animales demuestran que la exposición de dieta calórica a madres produjeron descendencia con niveles más altos de citocinas inflamatorias, lo que afectó el desarrollo neuronal y el desarrollo de actividad conductual ansiosa (Cortés-Albornoz et al., 2021). Sin embargo, Sasaki et al. informó que la ansiedad en estos descendientes dependía de la edad, y los síntomas parecían disminuir con el tiempo (Sasaki et al., 2014). Aunque aún en investigación, la exposición a dietas altas en grasas aumentaron el volumen total del cerebro, así como el volumen de la amígdala medial y el prosencéfalo basal de la descendencia (Fernandes et al., 2021).

Estas evidencias confirman que la exposición a dietas con alto contenido energético durante el desarrollo embrionario, incrementa la susceptibilidad al desarrollo de ansiedad en la descendencia que se correlaciona con alteraciones en la estructura cerebral involucradas a la patología conductual.

# 2.5 Herencia intergeneracional y transgeneracional de fenotipos conductuales en la descendencia

La heredabilidad de la salud y el riesgo de enfermedad en humanos y otras especies implica influencias más allá del código genético. Si bien existen muchos éxitos en los estudios genéticos humanos a gran escala, sigue habiendo una cantidad sustancial de heredabilidad faltante que pueda explicar la diversidad de los fenotipos en los descendientes (Aiken & Ozanne, 2013). Las exposiciones ambientales, los factores estresantes psicosociales y la nutrición son influencias potencialmente importantes que pueden afectar la salud de los individuos directamente o mediante su interacción con el genoma o el epigenoma a lo largo de generaciones (Weber-Stadlbauer, 2017). La creciente evidencia, principalmente en animales, sugiere que las exposiciones ambientales pueden generar o perpetuar resultados de salud alterados a lo largo de una o más generaciones. Un mecanismo putativo para estos efectos en la salud ambiental es a través de una regulación epigenética alterada (Breton et al., 2021).

Debido a que las exposiciones maternas a nivel de la F0 ocurren durante el embarazo, se tiene bien caracterizado que durante esta etapa se puede afectar al feto (F1), así como a sus gametos F1 en desarrollo que dan lugar a la gran descendencia F2, solo los patrones de transmisión materna que se extienden a la generación F3 cumplen con los criterios más estrictos para la herencia transgeneracional (Lecoutre et al., 2018).



**Figura 5**. Representación de los patrones de herencia de la generación padre (F0) al hijo (F1), nieto (F2) y bisnieto (F3) en humanos y animales. Una exposición en F0 puede afectar directamente al feto en desarrollo (F1) ya las células germinales en F2; por lo tanto, ambas vías de transmisión se consideran intergeneracionales. Pueden observarse efectos transgeneracionales a partir de la generación F3 (Breton et al., 2021).

Por lo tanto, se cree que existe una interacción compleja entre los factores genéticos y ambientales, que influyen en la aparición tanto de la depresión como de la ansiedad. Los modelos preclínicos del trastorno depresivo mayor indican que la exposición crónica al estrés conduce a fenotipos similares a la depresión y la ansiedad en modelos de roedores (Saavedra-Rodríguez & Feig, 2013). Curiosamente, estos fenotipos pueden transmitirse a la descendencia masculina y femenina en las generaciones F1 y F2 luego de la exposición paterna al estrés social crónico durante la adolescencia o la edad adulta temprana (Cunningham et al., 2021; Liberman et al., 2019). Los estudios que examinan la transmisión paterna de fenotipos similares a la ansiedad y depresión indican que la exposición a estrés en los primeros años de vida tiene alta importancia en la transmisión de tales fenotipos a la descendencia en las siguientes generaciones (Franklin et al., 2010, 2011).

En su conjunto, son necesarias más investigaciones para determinar si el tipo de estrés (dietas calóricas), el momento del estrés (posnatal vs adolescente vs adulto) y la duración del estrés influyen en la transmisión de fenotipos de ansiedad y/o depresión a las siguientes generaciones por herencia transgeneracional. El estudio de los mecanismos transgeneracionales de la conducta puede ser costosos y de gran alcance, por lo que, hasta nuestro conocimiento, nuestro trabajo representa uno de los únicos estudios en caracterizar los cambios estructurales y su correlación con la conducta de ansiedad y/o depresión a través de tres generaciones.

# JUSTIFICACIÓN

La exposición a dietas con alto contenido energético durante etapas gestacionales y los desórdenes psiquiátricos comparten alteraciones cerebrales. Se desconoce si la programación gestacional promueve defectos estructurales en el cerebro del feto que puedan favorecer el desarrollo de conductas aberrantes relacionadas a la depresión y ansiedad posterior al nacimiento. De interés, no existe evidencia que demuestre si la programación fetal de dichas conductas aberrantes puede transmitirse transgeneracionalmente a la descendencia.

En este trabajo emplearemos un modelo murino para identificar el efecto de la programación fetal por exposición a nutrientes hipercalóricos en el desarrollo de defectos estructurales del cerebro que promuevan conducta similar a la depresión y ansiedad de la descendencia, y si este fenotipo se transmite a las siguientes generaciones por herencia transgeneracional.

# HIPÓTESIS

La programación nutricional materna promueve cambios en la estructura cerebral y defectos en conductas similares a la depresión/ansiedad en la descendencia con potencial de transmisión transgeneracional

# **OBJETIVOS**

# 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la programación fetal por exposición a dieta con alto contenido energético en la herencia transgeneracional del fenotipo depresivo/ansioso y su correlación con defectos en la estructura cerebral

# 5.2 Objetivos específicos

- Identificar la generación del fenotipo depresivo/ansioso inducido por la exposición fetal a dieta con alto contenido energético en la descendencia F1.
- Caracterizar los cambios macro y microestructurales del cerebro de la descendencia F1 asociados al fenotipo depresivo/ansioso.
- Evaluar la transmisión inter y transgeneracional del fenotipo depresivo/ansioso inducido por la programación fetal con dieta hipercalórica en la descendencia F2 y F3.
- Caracterizar los cambios cerebrales macro y microestructurales en la descendencia F2 y F3 asociados al fenotipo depresivo/ansioso.

# MATERIAL Y MÉTODOS

# 6.1 Material de Laboratorio

Tabla 1. Material Biológico y No biológico		
No Biológico		
•	Comida estándar para rata (LabDiet/ No. Catálogo 5001).	
	Dieta de cafetería (CAF) con 372 Kcal/100g distribuidas	
	en 39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas.	
	Estuche de disección.	
	Rat Brain Atlas, Paxinos y Watson.	
•	Vaso de precipitado de 50 mL, 100 mL, 1000 mL	
•	Matraz de aforación 500 mL y 1000 mL	
•	Micropipetas eppendorf de 1000 µL, 100 µL, 10 µL.	
	Puntillas para micropipetas: azules, amarillas y blanca,	
	estériles.	
	Tubos eppendorf de 1.5 mL, 0.6 mL y 0.2 mL, estériles.	
•	Tubos Falcon 50 mL y 15 mL, estériles.	
■	Guantes sin talco.	
	Gradillas de plástico.	
Biológico		

• Ratas Wistar (n=97 distribuidas entre los 3 grupos)

Sexo: machos y hembras.

Peso: 250-300 gramos

Edad: 8 – 12 semanas.

# Reactivos

- Paraformaldehído (SIGMA-ALDRICH P6148-1KG)
- ProHance Gadoteridol 0.5M (BRACCO)
- Etanol grado reactivo (CTR Scientific)
- Fomblin (SIGMA-ALDRICH 317926-100G)

## **Equipos de Laboratorio**

- Microcentrífugas
- Resonador Bruker 7T modelo Bipspin 7.0 teslas (7.0T)

300 Mhz Software Paravision 6.01

# 6.2 Metodología

# **6.2.1 Modelos animales**

Se emplearon 152 ratas macho de la cepa Wistar que conformaron las generaciones F1 (n= 31), F2 (n= 51) y F3 (n= 70). Se emplearon machos de 8 – 12 semanas de edad y un peso entre 250 - 300 gramos. Los animales fueron producidos y manejados en el laboratorio de Neurometabolismo, Instituto de Neurobiología UNAM y Bioterio del CIDICS de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. Todos los sujetos fueron alojados individualmente en jaulas, mantenidos a 20-23 ° C en una habitación con

temperatura controlada con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. El agua estuvo disponible *ad libitum* en la jaula del hogar, excepto durante la sesión experimental.

#### 6.2.2 Programación Fetal de la descendencia F1

Las ratas Wistar hembra vírgenes de 10 semanas de edad (n = 12) se mantuvieron en sus jaulas durante al menos 10 días para aclimatarse con acceso a la dieta Chow estándar y al agua ad libitum. Las hembras fueron expuestas a dos fórmulas dietéticas: Control Chow (CON) (n=6) y Cafetería (CAF) (n=6), según nuestro protocolo previamente utilizado (Camacho et al., 2017; Montalvo-Martínez et al., 2018; Trujillo-Villarreal et al., 2021). La formulación de dieta para la dieta CON contenía una densidad calórica de 3,35 kcal/g dividida en 58 % de carbohidratos, 13 % de lípidos y 29 % de proteínas (Purina, Labdiet, St. Louis, MO, Cat. 5001). La dieta CAF estuvo compuesta por chocolate líquido, galletas, tocino, papas fritas, dieta estándar y paté de cerdo en proporción 1:1:1:1:1:2. CAF chow tiene 3,72 kcal/g totales: 39% hidratos de carbono, 49% lípidos, 12% proteínas y 513,53 mg de Sodio (Tabla 2). Se alimentaron ratas hembra con dietas CON o CAF durante 9 semanas, incluidas 3 semanas de pregestación, gestación y lactancia. Al comienzo de la semana 4, las ratas hembra se aparearon con machos Wistar (12 a 14 semanas de edad, 300-350 g, un macho/tres hembras), durante dos días. Se registró el tapón vaginal como posible primer día de apareamiento. Los hijos machos de madres expuestas a la dieta CON (n=11) o CAF (n=20) fueron destetados el día 21 postnatal. Los hijos de madres expuestas a la dieta CON se mantuvieron bajo la dieta CON y los hijos de madres expuestas a la dieta CAF cambió a la dieta CON hasta cumplir 2 meses de edad (±4 machos por hembra) (Fig. 6). Al alcanzar los 2 meses de edad, 11 ratas macho del grupo control y 20 ratas macho del grupo de programación fetal por exposición a dieta de cafetería se sometieron a las pruebas conductuales para evaluar las conductas similares a la ansiedad y depresión que incluyen: campo abierto, alimentación novedosa suprimida, cámara oscura e iluminada, laberinto elevado, suspensión de cola y nado forzado.



**Figura 6 Línea de tiempo seguida para la generación de los diferentes grupos de estudio.** La línea de tiempo abarca desde 3 semanas antes de la cruza, durante el período de gestación, lactancia y destete. La línea verde indica los períodos de alimentación con alimento control, mientras que la línea roja los períodos con alimentación CAF. Se generaron 2 grupos donde el primer grupo corresponde a la alimentación de la madre y de la descendencia con dieta control, para el segundo grupo, la madre fue alimentada con dieta cafetería y su descendencia con dieta control. Generando así descendencias machos F1.

# Tabla 2

Componente	Chow	Cafetería
Densidad calórica	3.35 Kcal/g	3.72
		Kcal/g
Carbohidratos	71%	39%
Lípidos	11%	49%
Proteína	18%	12%

Distribución de macronutrientes de las distintas dietas empleadas

# 6.2.3 Fenotipificación de conducta similar a la ansiedad en la descendencia

# 6.2.3.1 Prueba de campo abierto

- Se permitió a los modelos animales explorar libremente la arena de 50 x 50 x 50 cm (Fig. 7A).
- Se videograbó por 5 minutos el recorrido total en la arena empleando un sistema automático de sensor de movimiento de la compañía OMNIALVA.
- Se analizó la distancia total recorrida, tiempo que paso en el centro y en las orillas de la arena, empleando el software ToxTrac.
- Tanto el tiempo que pasó en el centro y las orillas, fueron tomadas en cuenta como índices de ansiedad, mientras que la distancia total recorrida para su medición de actividad locomotora.

## 6.2.3.2 Prueba de alimentación novedosa suprimida

- Los modelos animales fueron sometidos a una privación de alimentos por 18 horas con agua ad libitum antes de la prueba.
- La prueba consistió en colocar un pellet de alimento chow en el centro de la arena de acrílico de 50 x 50 x 50, misma usada para la prueba de campo abierto (Fig. 7A).
- Los modelos de estudio se posicionaron desde una esquina de la arena y fueron videograbados por 5 minutos.
- 4. Se cuantificó el tiempo que tardaron los modelos para alcanzar el alimento en el centro de la arena, siendo este la zona más estresante para el modelo animal.
- Una vez alcanzado el alimento, los modelos animales fueron trasladados a su jaula hogar con su alimento previamente pesado.
- Se cuantificó el tiempo que tardó para alimentarse en su jaula hogar y la cantidad de ingesta de su alimento por los próximos 20 minutos.
- La latencia para alcanzar su alimento en el centro de la arena fue tomada como índice de ansiedad, mientras que los parámetros cuantificados en la jaula hogar como control de hambre entre los grupos.

# 6.2.3.3 Prueba de cámaras iluminada y oscura

 En esta prueba los modelos de estudio fueron colocados en una arena de acrílico dividida en 2 cámaras (Fig. 7B):

- a. Cámara iluminada: Conformada por paredes de acrílico de color blanco sin techo y una lampara que iluminaria toda la superficie.
- b. Cámara oscura: Hecha de acrílico color negro cubierta de la parte superior con una pared de acrílico negro quedando totalmente cerrada.
- 2. La prueba consistió en colocar al modelo animal en la cámara oscura.
- Se cuantificó la latencia de la rata para salir de la cámara oscura, además del total de entradas a la cámara iluminada por 10 minutos.
- Tanto la latencia como el número de entradas fueron tomados en cuenta como índices de ansiedad en los modelos.

# 6.2.3.4 Prueba de laberinto elevado

- 1. En esta prueba los modelos de estudio fueron colocados en el centro de una plataforma en forma de cruz con 4 brazos (Fig. 7C):
  - Brazos cerrados: 2 brazos delimitados con paredes de 30 cm de alto con base de 50 cm de largo y 10 cm de ancho hechas de acrílico.
  - Brazos abiertos: 2 brazos de 50 cm de largo y 10 cm de ancho sin paredes laterales que lo delimiten. Además, estos brazos fueron iluminados de forma directa con luz blanca, creando una zona más estresante para el modelo.
- La prueba consistió en videograbar por 5 minutos el recorrido de la rata en el laberinto.

 Se cuantificó el tiempo que permanecía en los 2 brazos cerrados y en los 2 brazos abiertos, donde estos parámetros fueron tomados en cuenta como índices de ansiedad en el modelo.



**Figura 7. Representación de las cajas utilizadas para las pruebas conductuales.** A) La arena del campo abierto consiste en una caja de acrílico de 50 x 50 con paredes transparentes utilizada también para la prueba de alimentación novedosa suprimida. B) Se utilizó una caja con una cámara iluminada por luz blanca con paredes blancas y una cámara oscura totalmente cerrada con paredes oscuras. C) Para la prueba de laberinto elevado, se utilizó una plataforma en forma de cruz con 2 brazos abiertos y 2 brazos cerrados por paredes oscuras, midiendo 50 cm de largo y 10 cm de ancho cada plataforma.

# 6.2.4 Fenotipificación de conducta similar a la depresión en la descendencia

# 6.2.4.1 Prueba de suspensión de la cola

 Las ratas Wistar fueron suspendidos por sus colas con sujetadores de plástico de forma individual, en una posición que no podían escapar o sostenerse de superficies cercanas en el centro de una caja de acrílico (Fig. 8A).  Durante la prueba, se mantuvieron por 6 minutos suspendidos por su cola y fueron videograbados para la posterior cuantificación del tiempo de inmovilidad indicativo de una conducta similar a la depresión.

# 6.2.4.2 Prueba de nado forzado

- En esta prueba, se utilizaron cilindros de acrílico de un diámetro de 30 cm (Fig. 8B), donde se llenaron de agua a una temperatura de 23 ± 1 °C a una altura de 70 cm de manera que la rata no podría tocar el fondo con sus patas traseras.
- Se colocaron las ratas de manera individual en los cilindros rellenados con agua limpia entre cada modelo por 7 minutos.
- Se comenzó la videograbación en los últimos 5 minutos, donde los primeros 2 minutos fueron tomados como acondicionamiento al nado.
- 4. Se midió el tiempo de inmovilidad, de lucha y de nado de cada rata, donde estos parámetros fueron utilizados para calcular sus índices depresivos.



**Figura 8 Representación de las cajas utilizadas para las pruebas conductuales.** A) La caja utilizada para la prueba de suspensión de cola consiste en 3 cámaras rectangulares delimitadas con paredes a los lados que permite evitar que un modelo se estrese por la presencia de otro durante la prueba. B) Se muestra la representación del cilindro hecho de acrílico donde se realizó la prueba de nado forzado.



**Figura 9.** Línea de tiempo seguida para la realización de las pruebas conductuales. Para cada rata descendiente, se sometieron a una batería de pruebas a los 60 días de edad, incluyendo campo abierto (OF), alimentación novedosa suprimida (NSFT), caja iluminada y oscura (LDB), laberinto elevado (EM), suspensión de cola (TS) y nado forzado (FST). Posterior a las pruebas, se sometieron a eutanasia recuperando el cerebro para su posterior análisis por resonancia y técnicas histológicas.

# 6.2.5 Herencia transgeneracional del comportamiento similar a la depresión o la ansiedad

Las ratas Wistar macho de la generación F1 y F2, clasificadas con un comportamiento similar a la depresión o la ansiedad, se aparearon con hembras vírgenes (n = 12) (200-250 g, 10 semanas de edad) para generar la descendencia F2 y F3, respectivamente. Posteriormente, tres machos F1 con la puntuación más alta de fenotipo de comportamiento similar a la depresión o ansiedad y nacidos de madres alimentadas con CON o CAF se aparearon con hembras vírgenes control (n=2 hembra/macho, n=6 hembras vírgenes) por 2 días. Después del apareamiento, los machos fueron retirados de la jaula de origen (Fig. 10). La presencia de un tapón vaginal denotó el día 1 de gestación. Cada una de las ratas preñada se alojaron individualmente y se alimentaron con dieta chow durante el embarazo y la lactancia. Las crías macho F2 de CON (n= 29) o aquellas de las madres alimentadas con CAF (n= 22) fueron destetadas el día 21 posparto y mantenidas con dieta Chow hasta alcanzar las 8 semanas de edad para diagnosticar el fenotipo conductual como se describió para las crías F1 (Fig. 9). Como se comentó, tres machos F2 clasificados con la puntuación más alta de fenotipo de comportamiento similar a la depresión o ansiedad y nacidos de madres alimentadas con CON o CAF se aparearon con hembras vírgenes de control (n=2 hembra/macho, n=6 hembras vírgenes) por 2 días. Las crías F3 (CON, n= 28; CAF, n= 42) se destetaron el día 21 posparto y se mantuvieron con dieta Chow hasta alcanzar las 8 semanas de edad para diagnosticar el fenotipo conductual como se describe para las crías F1 (Fig. 9).



**Figura 10 Diseño de estudio del efecto inter y transgeneracional de la dieta materna.** Representación gráfica del diseño del modelo de programación materna para estudiar el efecto transgeneracional de la dieta materna que ilustra la herencia intergeneracional (F1 a F2) y la herencia transgeneracional (F1 a F3).

# 6.2.6 Clasificación del fenotipo conductual mediante análisis de componentes principales

El análisis PCA se realizó utilizando el paquete FactoMineR (Lê et al., 2008) en R para clasificar los resultados de comportamiento en la descendencia F1, F2 y F3 dictados por la exposición a la dieta prenatal (dieta CON vs CAF). El propósito de PCA es derivar una pequeña cantidad de combinaciones lineales (componentes principales) de un conjunto de variables de comportamiento que retienen la mayor cantidad posible de información en las variables originales y reducen la dimensionalidad (Jang, 2021). Como segundo paso, realizamos k medias como un análisis de conglomerados no lineal no supervisado utilizando el paquete ClusterR (Mouselimis, 2022). Este procedimiento realiza un análisis de conglomerados disjuntos sobre la base de las distancias calculadas a partir de una o más variables cuantitativas, utilizando distancias euclidianas (modelo de k-medias) para calcular los centros de los conglomerados.

# 6.2.7 Perfusión intracardiaca

- Los modelos animales de todos los grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo de programación fetal para la generación F1 (Control, n=11; CAF, n=20), F2 (Control, n=22; CAF n=23) y F3 (Control, n=42; CAF, n=44), fueron sacrificados por sobredosis de Pentobarbital (PiSA Agropecuaria) (1mL) por vía intraperitoneal
- Se realizó disección dérmica que va desde la región abdominal hasta la parte superior de la caja toráxica, exponiendo el corazón.
- 3. Se perforó el ventrículo izquierdo del corazón siguiendo su vértice y se realizó un corte en la aurícula derecha, con el fin de abrir el sistema circulatorio. Se perfundió solución de lavado PBS 0.1M + Heparina + Gadolineo (6 mM) empleando una bomba de perfusión (Fisher Scientific GP1000) a flujo de 20 ml/min.

- Posteriormente, se cambió la solución de lavado por la solución fijadora que incluye al paraformaldehído 4% en PBS 0.1M (PFA) + Gadolineo 6 mM durante 20 min, siguiendo el mismo flujo.
- 5. Se colectó el cerebro protegido por el cráneo del modelo y se removió la piel,
  la mandíbula inferior, las orejas y la punta de la nariz cartilaginosa.
- Las muestras se almacenaron a 4°C en PFA al 4% Prohance 6 mM por 24 horas y posteriormente se cambió la solución a PBS 0.1M con azida de sodio 0.02% hasta su posterior análisis en la resonancia.

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

# 6.2.8 Obtención de imágenes de Resonancia Magnética Nuclear

 Los 152 cerebros de los modelos animales protegidos por el cráneo que incluyen los grupos CON y CAF de las generaciones F1, F2 y F3 se colocaron individualmente para su análisis en un cilindro transparente con fondo en punta con 35mL de Formblin, un perfluoropoliéter (SIGMA-ALDRICH 317926-100G) que tiene un efecto dieléctrico bajo y una señal de RM mínima, con lo que aumenta el contraste y elimina los artefactos de susceptibilidad no deseados próximos a los límites del cerebro. Además, se evitó la formación de burbujas en el interior.

- Se introdujeron los cilindros en la bobina del resonador a 45cm de distancia de la entrada al centro del resonador y se alinearon con el cráneo en dirección al resonador.
- 3. Las imágenes de los cerebros se adquirieron usando resonador Bruker 7 T Paravisión 6.0.1 system, donde la relación señal/ ruido se llevó aproximadamente a 20 gastando una resolución mejorada, ya que es el valor que proporciona una compensación óptima para el registro de la computadora.
- 4. Se posicionó el cráneo en el resonador mediante la rotación de la imagen prediseñada evaluó la homogeneidad del campo observando el contraste de la imagen. Se utilizó una antena de superficie Tx/Rx con 72 mm de diámetro.
- 5. Se obtuvieron las imágenes con una secuencia Bruker flash nombrada en el resonador como Garza\_Exvivo\_DBM\_60um que cuenta con los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR) / tiempo de eco (TE) = 39.26 / 11.00 ms, tamaño de matriz = 364 x 500 x 336, campo de visión 22 x 30 x 20 mm, resolución espacial de 0.060 x 0.060 x 0.060 mm y ángulo de giro = 20 con 376 rebanadas de imágenes con orientación sagital con una duración de 2 horas y 45 minutos por sujeto.
- 6. Inmediatamente después, se adquirieron conjuntos de datos para imágenes de tensor de difusión (DTI) utilizando una secuencia de imágenes ecoplanares con los siguientes parámetros: TR = 2000 ms, TE = 22,85 ms, NA = 2, espesor de corte = 195  $\mu$ m, FOV 22 x 15 mm2, matriz = 126 x 86, lo que produce una resolución en el plano de 175 × 174  $\mu$ m2, tiempo de exploración = 12 min. Las imágenes ponderadas por difusión se adquirieron en treinta direcciones únicas

 $(\delta/\Delta = 2,9/8,7 \text{ ms})$ , cada una con valores b (1000s/mm2) junto con 6 imágenes sin ponderación por difusión.

7. Se evaluó la calidad de imagen observando irregularidades en el campo (artefactos por burbujas). Las imágenes se cargaron a la nube virtual del laboratorio en formato DICOM, a través del cual se pudieron descargar para futuros análisis.

#### 6.2.9 Preparación de datos provenientes de imágenes por resonancia magnética

Cada imagen obtenida por secuencia T1 Garza\_Exvivo\_DBM\_60um se sometió a un preprocesamiento de imagen, mediante un pipeline elaborado en el laboratorio B03 a cargo del Dr Eduardo Garza Villarreal. Este pipeline cuenta con diferentes pasos que ayudan a mejorar la resolución de la imagen para una mejora en el análisis por morfometría basado en deformación.

Las imágenes que se obtuvieron por el resonador son exportadas en formato Bruker y posteriormente son transformadas a formato nifti mediante el uso del software Brkraw, que, además, ordena en formato bids todos los archivos creados por la imagen en diferentes rutas de carpetas. Posteriormente, las imágenes nifti son transformadas a formato minc para el uso del pipeline basado en minc-tools (https://github.com/Mouse-Imaging-Centre/pydpiper) que realizó los siguientes pasos: imagen central, máscara completa y corrección de campo de sesgo N4. Luego utilizamos un enfoque basado en el registro de imágenes para evaluar las diferencias anatómicas entre los grupos. El registro de imágenes encuentra una transformación espacial suave que alinea mejor una imagen con otra, de modo que se superponen las características anatómicas correspondientes.

Se estandarizó el script del preprocesamiento en donde se incluye primero una corrección de los anillos de gibs para eliminar artefactos en la parte dorsal de las imágenes por resonancia magnética mediante la función mrgdegibbs. Posteriormente, se realiza un primer denoise mediante la función minc anlm para eliminar fluctuaciones de señal por algún problema de distribución en la relación señal/ruido de la imagen, al ser una resolución de 0.060mm, es un tamaño de voxel muy pequeño en donde los protones incluidos son menores y con esto disminuye la señal. Se crea una máscara de imagen inicial mediante la función mnccalc y una corrección del campo tipo N4 Bias mediante la función N4BiasFieldCorrection. Después, se someten a una segunda corrección de ruido mediante la función minc anlm. Posteriormente, se indican los templates y máscaras de correspondientes al atlas a utilizar, que en este caso es el atlas de Fisher344. Finalmente, se realiza un registro de las comprares de nuestros sujetos con el template del atlas indicado mediante la función antsRegistration y antsApplyTransforms para la máscara. A estas nuevas imágenes se les aplicó una última corrección de campo N4Bias mediante N4BiasFieldCorrection de 3 dimensiones para finalmente crear un control de calidad tipo lsq6, que permite evaluar la calidad de las imágenes y corroborar que todas las imágenes se llevaron al mismo espacio de imagen para poder analizarlas.



**Figura 11. Representación de imágenes obtenidas por resonancia magnética de imagen** *y su posterior tratamiento preprocesamiento. A) Imágenes crudas obtenidas por el resonador Bruker de 7T en formato DICOM, representando eje sagital y coronal (izquierdo y derecho respectivamente). B) Imágenes sagital y coronal después del tratamiento aplicado con el script de preprocesamiento de imágenes con las correcciones de campo en formato minc.* 

### 6.2.10 Análisis de imágenes de resonancia magnética de imagen por morfometría

### basado en deformación

Para el análisis, previamente usamos un enfoque de registro grupal basado en intensidad automatizado para alinear todos los cerebros separados por generación (F1, F2 y F3) en el estudio en un sistema de coordenadas común, produciendo una imagen promedio de los escaneos T1w por análisis. La deformación que alinea las imágenes se convierte en un resumen de cómo se diferencian. Para evaluar las diferencias de volumen entre los grupos, realizamos una morfometría basada en la deformación, ya que proporciona un vóxel continuo por definición de vóxel de los cambios de volumen (expansión / contracción) relacionados con la programación materna en la descendencia F1 y la subsiguiente herencia de los cambios cerebrales en los grupos F2 y F3. A continuación, se mapearon las deformaciones desde los escaneos individuales hasta la imagen promedio. Los campos de deformación finales se calcularon con un registro difeomórfico simétrico codicioso (el algoritmo SyN en ANTS) y luego se invirtieron y difuminaron con un núcleo de suavizado gaussiano FWHM de 0,1 mm. Se extrajeron los determinantes jacobianos de estas deformaciones, dando una medida de la expansión/contracción del volumen local en cada vóxel del cerebro. Se utilizaron determinantes jacobianos de transformación logarítmica (0,2 mm borrosos) para evaluar las diferencias entre los grupos porque estiman mejor una distribución normal. Con esto, obtenemos los determinantes jacobianos que son utilizados para el análisis por un modelo lineal generalizado en el paquete estadístico Rstudio con la siguiente ecuación:

jacobians = Valor jacobiano obtenido por morfometría

Grupo= F1 CON no-ansioso (n= 10), F1 CON ansioso (n= 1), F1 CAF no-ansioso (n= 8), F1 CAF ansioso (n= 12), F2 CON no-ansioso (n= 21), F2 CON ansioso (n= 8), F2 CAF no-ansioso (n= 10), F2 CAF ansioso (n= 12), F3 CON no-ansioso (n= 23), F3 CON ansioso (n= 5), F3 CAF no-ansioso (n= 29) y F3 CAF no-ansioso (n= 13).

weight = Peso en gramos de las ratas el día de la eutanasia.

Database = base de datos de donde se obtuvo estos valores.

Posteriormente, se realizó la corrección del modelo lineal generalizado con FDR del 5 al 20%, donde obtuvimos un punto de corte para los cambios de volumen cerebral dentro de las regiones que posteriormente fueron identificadas con base al atlas Fisher 344 y creación del mapa de cambios estructurales para cada una de las generaciones en la comparación de grupos Cafetería vs control correspondiente.

# 6.2.11 Análisis de imágenes de resonancia magnética de imagen basado en difusión

Los conjuntos de datos de DWI fueron eliminados y corregidos por movimiento y distorsiones inducidas por corrientes parásitas usando transformaciones lineales (12 grados de libertad). Para estimar el tensor de difusión se utilizó el paquete de software MRtrix 3.0 (Luna-Munguia et al., 2021; Tournier et al., 2019), del cual obtuvimos los valores propios correspondientes ( $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2 y  $\lambda$ 3). A partir de estos, creamos mapas cuantitativos de FA, coeficiente de difusión aparente (ADC), difusividad axial (es decir,  $\lambda$ 1; D $\parallel$ ) y difusividad radial ([ $\lambda$ 2 +  $\lambda$ 3]/2; D<sup>⊥</sup>). Los parámetros de DTI se analizaron utilizando los principales mapas de difusividad (con la ayuda de las imágenes ponderadas sin difusión) para delinear manualmente las regiones de interés (ROI), el cuerpo calloso, el fórnix, la fimbria, la cápsula interna, el lóbulo cerebeloso 3, el lóbulo cerebeloso 6, el hipocampo y la amígdala.

# 6.2.12 Análisis de inmunomarcadores de tejidos cerebrales

### 6.2.12.1 Procesamiento de tejidos en parafina e inmunohistoquímica

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

2:1, 1:1, 1:2 xileno: parafina por 30 minutos y 2 incubaciones con parafina 100% por 2 horas.

- 5. Los cerebros embebidos en parafina fueron cortados en un criostato en secciones coronales de 5 μm de espesor en dirección rostro-caudal, a nivel de regiones correspondientes a NAc, Hipocampo y PFC, localizadas con el atlas de cerebro de rata Paxinos, George, and Charles Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier, 2006.
- Los cortes se hidrataron siguiendo la secuencia de Xilol (15 minutos), Etanol absoluto y Xilol 1:1 (10 minutos), Etanol absoluto (5 minutos), Etanol 96% (5 minutos) y finalmente agua destilada.
- Se realizó la recuperación de epítopos sumergiendo los cortes en buffer de Citratos a 90°C durante 20 minutos
- Los cortes se lavaron con PBS+TritonX-100 0.1% y se incubaron con el bloqueador de peroxidasa durante 10 minutos (Kit AB64264)
- Se lavaron con PBS+TritonX-100 0.1% y se incubaron con el bloqueador de proteínas durante 10 minutos (Kit AB64264)
- Se incubaron con PBS+TritonX-100 0.1% y posteriormente con el anticuerpo primario anti-sinaptofisina con dilución de 1:200 (ab14692) a 4°C durante toda la noche.
- Se realizaron lavados en PBS (3 lavados de 5 minutos) y se incubaron en anticuerpo secundario (Kit AB64264) de IgG de cabra anti-conejo biotinilado por 10 minutos.
- Se realizaron lavados en PBS (3 lavados de 5 minutos) y posteriormente incubación con estreptavidina (AB64264) por 10 minutos.
- Se añadieron 2 gotas de una solución del cromógeno diaminobencidina DAB
  (30µL en 1.5mL de substrato) y se incubó por 10 minutos.
- 14. Se realizó la tinción hematoxilina como tinción de contraste.
- Se deshidrataron los tejidos con la secuencia 95%, 80% y 50% etanol por 15 segundos, después 2:1 etanol: xilol, 1:1 etanol xilol, 100% xilol
- 16. Se realizó el montaje del corte con solución de montaje en cubreobjetos.

### 6.2.12.2 Análisis de tejidos cerebrales por tinción hematoxilina

Las secciones fueron desparafinadas siguiendo la secuencia de Xileno (15 minutos), etanol absoluto y Xileno 1:1 (10 minutos), etanol absoluto (5 minutos), etanol 96% (5 minutos) y finalmente agua destilada. Los cortes se tiñeron en solución de hematoxilina durante 8 minutos y luego se lavaron durante 5 minutos con agua corriente del grifo. Luego, las rodajas se diferenciaron en alcohol ácido al 1% durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 1 minuto. A continuación, se sumergieron durante 30 segundos en agua amoniacal y solución saturada de carbonato de litio durante 30 segundos. Finalmente, los cortes se lavaron con agua corriente del grifo y se tiñeron en solución de eosina-floxina durante 5 minutos. Al final, los cortes fueron deshidratados con alcohol al 95%, 2 cambios de alcohol absoluto de 5 minutos cada uno y aclarados en 2 cambios de xileno de 5 minutos cada uno. Los cortes se montaron con medio de montaje basado en xileno.

### 6.2.12.3 Análisis de tejidos cerebrales por tinción de kluver barrera

Las secciones fueron desparafinadas siguiendo la secuencia de Xileno (15 minutos), etanol absoluto y Xileno 1:1 (10 minutos), etanol absoluto (5 minutos) y finalmente etanol 96% (5 minutos). Los cortes se incubaron durante la noche en una solución de azul Luxol al 0,1 % a temperatura ambiente. Posteriormente, se enjuagaron en alcohol 96 para eliminar el exceso de tinte y en agua destilada hasta que deje de decolorarse. Se realizó la diferenciación en alcohol de 70 hasta distinguir la sustancia gris y blanca. Finalmente, se incubaron con solución de violeta de cresilo durante 10 minutos y luego se lavaron en alcohol 96 y se deshidrataron en alcohol absoluto y xileno.

#### 6.2.13 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM para todos los datos. Todos los análisis estadísticos, incluida la prueba de la normalidad de la distribución de datos, se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 y se consideró significativo un valor de p corregido <0,05. Se probó la normalidad de todos los resultados usando la prueba de Shapiro-Wilk. Para las diferencias significativas en los respondedores altos y bajos durante el condicionamiento operante, usamos la prueba de Chi-cuadrado por muestra. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y diferencias significativas p < 0,05. El análisis estadístico de MBD se realizó utilizando los determinantes jacobianos transformados logarítmicamente como variable dependiente, "grupo de programación fetal" como variable independiente (entre sujetos) y como covariable incluimos "fenotipo y peso". Comparamos los grupos usando un GLM y los análisis se corrigieron para comparaciones múltiples usando la tasa de descubrimiento falso (FDR) al 5 %. Además, extrajimos los valores t de los picos significativos y los comparamos mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un Bonferroni posthoc para comparar cada valor jacobiano de los picos significativos para todos los grupos. Comparamos los resultados de FA, AD, ADC y RD de cada región de interés para grupos por generación utilizando ANOVA posthoc Bonferroni. Los detalles sobre el análisis estadístico están disponibles en el script R de acceso abierto (ver arriba).

### **CAPITULO 7**

### RESULTADOS

#### 7.1 Pruebas Conductuales

### 7.1.1 La programación fetal de madres por dieta con alto contenido energético induce conducta depresiva de manera intergeneracional en la descendencia

Se realizó el diagnóstico del fenotipo conductual individual para determinar el efecto de la exposición prenatal a la dieta de cafetería en el comportamiento similar a la depresión y/o ansiedad en la descendencia. Inicialmente, encontramos que la exposición a la dieta CAF aumentó el tiempo de inmovilidad de la descendencia F1 en la prueba de suspensión de la cola (M = 188,6, SD = 25,64) en comparación con el grupo de control (M = 155,6, SD = 36,86) (Fig. 12A; t (18) =2.324, \*p=0.032). Además, la descendencia F1 expuesta prenatalmente a la dieta CAF mostró un mayor tiempo de inmovilidad (grupo F1 CAF M = 159.4, SD = 46.18; grupo F1 CON M = 87.36, SD = 44.13) (Figura 12B; t (28) = 4.181, \* \*\*p=0,0003), y menor tiempo de nado durante la prueba de nado forzado (M=131,8, SD=52,19) en comparación con los sujetos F1 expuestos a la dieta de control (M=191,4, SD=35,32) (Fig. 12C; t (29) =3.372, \*\*p=0.0021). En consecuencia, la descendencia F2 y F3 nacida de la descendencia F1 CAF no mostró una alteración significativa en el tiempo de inmovilidad durante la prueba de suspensión de la cola en comparación con la descendencia F2 (Fig. 12D; F2 CAF M = 210.3, SD = 33.83, F2 CON M = 218,1, SD = 35,60; t(21) = 0,509 p=0,6155) y con las crías F3 expuestas a la dieta CON (Fig. 12G; F3 CAF M=171,3, SD=48,39, F3 CON M=164,5, SD=55,25; t (21)=0.529

p=0.5980), respectivamente. En particular, la descendencia F2 expuesta a la dieta CAF mostró un aumento en el tiempo de inmovilidad (grupo F2 CAF M = 209.2, SD = 43.81; grupo F2 CON M = 152.5, SD = 56.47) (Figura 12E; t (14) = 2.254 \* p =0,0407) y menos tiempo de nado (M=59, SD=30,67) en comparación con la F2 CON (M=117,5, SD=68,67) durante la prueba de nado forzado (Fig. 12F; t(15)=2,316 \*p =0,0351). Finalmente, al contrario de los resultados de comportamiento encontrados en la descendencia F1 y F2, la descendencia F3 nacida de individuos expuestos a la dieta CAF mostró menos tiempo de inmovilidad (grupo F3 CAF M = 134.5, SD = 60.58; grupo F3 CON M = 178.9, SD = 58,91) (Fig. 12H; t(67)=3,021 \*\*p=0,0036) y más tiempo de nado en comparación con los descendientes F3 expuestos a la dieta CON durante la prueba de nado forzado (grupo F3 CAF M=150, SD=55,92; Grupo F3 CON M = 110,4, DE = 58,3 (Fig. 12I; t (67) = 2,84 \*\* p = 0,006).



**Figura 12.** Comparaciones de los resultados conductuales similares a la depresión de las descendencias macho control y cafetería de cada generación F1, F2 y F3. La descendencia de los grupos control y cafetería de cada generación fueron sometidos a pruebas conductuales para evaluar su condición de depresión. Para la prueba de suspensión de cola, se compararon los tiempos de inmovilidad (A, D y G) entre los grupos control (CON) y cafetería (CAF) en cada generación. En la prueba de nado forzado, se comparó el tiempo inmóvil en el agua (B, E y H) y el tiempo de nado (C, F e I) de los grupos CAF comparado con sus respectivos grupos CON de cada generación. Los resultados mostrados en las gráficas están expresados como el promedio  $\pm$  SEM, seguido de prueba t student (\*p< 0.05 y \*\* p< 0.01 vs grupo control). CON = control (gris), CAF = cafetería (negro).

### 7.1.2 La programación fetal de madres por dieta con alto contenido energético induce conducta ansiosa con efecto transgeneracional.

Evaluamos el efecto transgeneracional de la programación fetal en el comportamiento similar a la ansiedad de las generaciones F1, F2 y F3.

#### 7.1.2.1 Conducta similar a la ansiedad en la descendencia F1

Inicialmente, encontramos que la programación materna por exposición a la dieta CAF reproduce un comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia F1, evidenciada por mayor tiempo de ubicación en las orillas (Fig. 13A; F1 CON M= 71.14 SD= 10.44 vs F1 CAF M= 78.90 SD= 7.26, t(27)=2.35 \*p= 0.0264) y menor tiempo en el centro de la arena durante la prueba de campo abierto cuando se comparó con la descendencia F1 expuesta a dieta CON (Fig. 13B; F1 CON M= 27.14 SD=10.60 vs F1 CAF M=20.33 SD=6.64, t(27)=2.095 \*p= 0.0461). Después, evaluamos la hipofagia inducida por la exposición de los modelos a un ambiente novedoso durante la prueba de alimentación novedosa suprimida. La descendencia F1 expuesta a dieta CAF materna mostró mayor tiempo de latencia para alcanzar el pellet de alimento en el centro de la arena (Fig. 13C; F1 CON M=254.2 SD=181.7 vs F1 CAF M=420.5 SD=181.6, t(27)=2.34 \*p=0.0267), mientras que no hubo cambio en la latencia para alimentarse dentro de su jaula hogar comparado con el grupo control (Fig. 13D; F1 CON M=134.5 SD=94.79 vs F1 CAF M=155 SD=137.2, t(27)=0.4376 p= 0.6649). Finalmente, la clasificación ansiosa de la descendencia F1 expuesta a dieta materna CAF fue confirmada con los resultados del laberinto elevado, mostrando mayor tiempo de estancia en los brazos cerrados comparados con su grupo F1 control (Fig. 13E; F1 CON M= 236.4 SD=34.07 vs F1 CAF M=264.5 SD=21.23, t(27)=2.65 \*p= 0.0137). Estos resultados muestran que la exposición materna a dieta cafetería durante períodos prenatales promueve la alteración conductual similar a la ansiedad en la descendencia.

## 7.1.2.2 La programación fetal por dieta de cafetería favorece la herencia transgeneracional de la conducta de ansiedad en la descendencia

Evaluamos si la dieta CAF expuesta prenatalmente de la descendencia F1 promueve la herencia transgeneracional del comportamiento similar a la ansiedad en las generaciones F2 y F3. Inicialmente, la descendencia F2 y F3 nacida de la descendencia F1 diagnosticada con comportamiento similar a la ansiedad no mostró cambios en el tiempo de permanencia en las orillas (Fig. 13F; F2 CON M=80.14 SD=14.36 vs F2 CAF M=84.70 SD= 7.36, t(19)=0.783 p= 0.4433; Fig. 13K; F3 CON M=70.33 SD=20.35 vs F3 CAF M=64.52 SD=18.55, t(60)=1.167 p= 0.2479) ni en el centro de la arena durante la prueba de campo abierto en comparación con los sujetos control (Fig. 13G; F2 CON M=19.86 SD=14.36 vs F2 CAF M=15.30 SD=7.36, t(19)=0.783 p= 0.4433; Fig. 13L; F3 CON M =29,67 DE=20,35 vs F3 CAF M=35,48 DE=18,55, t(60)=1,167 p= 0,2479). En particular, la descendencia F2 y F3 nacida de los sujetos ansiosos F1 conservaron los rasgos de ansiedad, incluido mayor tiempo para alcanzar el alimento en el centro de la arena durante el NSFT (Fig. 13H; F2 CON M = 202.7 SD = 125.3 vs F2 CAF M = 364.5 SD = 179.2, t(19)=2.42 \*\*p= 0.0257, Fig. 13M, F3 CON M=188.3 SD=146.8 vs F3 CAF M=287.9 SD=187.6, t(68)=2.343 \*p= 0.0.0221), y un aumento en el tiempo de ubicación en brazos cerrados del laberinto "T" elevado en comparación con las crías F2 y F3 expuestas a las dietas de control (Fig. 13J; F2 CON M=264.1 SD=26.76 vs F2 CAF M=283.7 SD=16.62, t(48)=2.970 \* \*p= 0.0.0046, Fig. 13O, F3 CON M=238.9 SD=32.08 vs F3 CAF M=260.4 SD=28.31, t(66)=2.911 \*\*p= 0.0049). No se encontraron cambios en la latencia para alimentarse en sus jaulas después de la NSFT (Fig. 13I; F2 CON M=121.9 SD=166.1 vs F2 CAF M=191.3 SD=205.1, U=43.50 p= 0.3008; Fig. 13N; F3 CON M=92.57 SD=55.40 vs F3 CAF M=144.2 SD=127.5, U=494 p= 0.0.2063) confirmando que los sujetos conservan porcentajes similares de ingesta de alimento. Estos datos confirman que la exposición prenatal a dieta CAF promueve la herencia transgeneracional del comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia.



**Figura 13.** Comparaciones de los resultados conductuales similares a la ansiedad de las descendencias macho control y cafetería de cada generación F1, F2 y F3. La descendencia de los grupos control y cafetería de cada generación fueron sometidos a pruebas conductuales para evaluar su condición de ansiedad. Para la prueba de campo abierto, se compararon las frecuencias en las orillas (A-C) y en el centro (D-F) entre los grupos control y cafetería en cada generación. Los resultados mostrados en las gráficas están expresados como el promedio  $\pm$  SEM, seguido de prueba t student (\*p< 0.05 vs

grupo control). En la prueba de alimentación novedosa suprimida, se comparó la latencia para alimentarse en la arena (G-I) y la latencia para alimentarse en su jaula hogar después de la prueba (J-L). Los resultados mostrados en las gráficas están expresados como el promedio  $\pm$  SEM, seguido de prueba t student (\*p< 0.05 y \*\* p< 0.01 vs grupo control). Para la prueba de laberinto elevado, se muestra la comparación de los tiempos de estadía en los brazos cerrados (M-O) de cada generación F1, F2 y F3 contra sus respectivos grupos control. Los resultados mostrados en las gráficas están expresados como el promedio  $\pm$  SEM, seguido de prueba t student (\*p< 0.05 y \*\* p< 0.01 vs grupo control).

# 7.1.2.3 El fenotipo ansioso prevalece transgeneracionalmente en los modelos animales expuestos prenatalmente a dieta cafetería

Para evidenciar las interacciones entre las variables de efectos de la dieta y el comportamiento de las generaciones F1, F2 y F3, aplicamos el análisis de componentes principales que nos permitieron categorizar a cada sujeto entre los grupos ansiosos y no ansiosos utilizando parámetros de prueba de comportamiento. El análisis PC1 frente a PC2 mostró que el 90,91 % de las crías F1 nacidas de madres expuestas a la dieta de control y el 42,86 % de las crías F1 nacidas de madres expuestas a la dieta CAF se clasificaron como comportamiento no similar a la ansiedad (Fig. 14A-C). Por el contrario, la exposición prenatal a la dieta CAF exhibió hasta el 57,14% de los descendientes F1 diagnosticados con un comportamiento similar a la ansiedad, comparado con solo el 9,09% de los descendientes F1 expuestos a la dieta de control (Fig. 14A-C). En consecuencia, encontramos que la descendencia F1 expuesta prenatalmente a la dieta CAF tenía más probabilidades que la descendencia F1 CON de tener un fenotipo de comportamiento similar a la ansiedad (X<sup>2</sup> (1, N = 31) = 6.910, \*\* p = 0.0086). En consecuencia, la descendencia F2 y F3 nacida de la descendencia F1 expuesta prenatalmente a la dieta CAF preservó a más individuos diagnosticados con un comportamiento similar a la ansiedad (Fig. 14D-I). El análisis PCA identificó que hasta el 55 % de los individuos F2 nacidos de la descendencia F1 expuesta a la dieta CAF fueron diagnosticados con un comportamiento similar a la ansiedad, en comparación con el 27 % de los individuos F2 nacidos de la descendencia F1 expuesta a la dieta Control (Fig. 14D-F). Por el contrario, el 72,41 % de los descendientes F2 nacidos de los individuos F1 de control y el 45 % de los individuos F2 nacidos de los descendientes F1 expuestos a la dieta CAF mostraron un comportamiento no similar al de la ansiedad (Fig. 14D-F) (X<sup>2</sup>(1, N=51) = 5,148, \*p=0,0233). Finalmente, la descendencia F3 nacida de los sujetos F1 expuestos a la dieta CAF conservó significativamente la clasificación de un fenotipo similar a la ansiedad, al mostrar un 32,50 % de los individuos mientras que el 17,24 % de la descendencia F3 nació de los sujetos F1 expuestos a la dieta control o CAF, respectivamente, se clasificaron como comportamiento no similar a la ansiedad ((Fig. 14G-I): X<sup>2</sup>(1, N=70) = 2,030, p= 0,1542).

Estos datos proponen que la programación fetal por exposición a dieta con alto contenido energético favorece el desarrollo de conducta similar a la ansiedad en la descendencia que se preserva en tres generaciones.



**Figura 14 Gráficas del análisis por componentes principales.** Clasificación de los grupos control y cafetería de la generación A-C) F1, D-F) F2 y G-I) F3 por PCA en ansioso y no ansioso. A, D y G) graficas biplot del clustering representando la distribución de los sujetos acorde a los componentes principales mayoritarios (PCA1 y PCA2) que explican más del 90% de la distribución de los datos de las pruebas conductuales de ansiedad seguido de gráficos circulares que representan la proporción de la población ansiosa y no ansiosa en los grupos de control y cafetería de cada generación.

#### 7.2 Análisis de estructura cerebral

Posterior al análisis del fenotipo conductual por el uso de PCAs, comparamos los volúmenes cerebrales de regiones específicas de los grupos de sujetos de las generaciones F1, F2 y F3 de acuerdo al siguiente diagnóstico:

- Sujeto expuesto a dieta control no ansioso: CON-NA

- Sujeto expuesto a dieta control ansioso: CON-A

- Sujeto expuesto a dieta cafetería no ansioso: CAF-NA

- Sujeto expuesto a dieta cafetería ansioso: CAF-A

Con ello se generó una matriz de comparaciones entre de 12 diferentes grupos de sujetos para las generaciones F1, F2 y F3.

### 7.2.1 La programación fetal de madres por dieta de cafetería muestra alteraciones en la estructura cerebral relacionada al fenotipo ansioso que se hereda transgeneracionalmente

Identificamos diferencias significativas en regiones específicas del cerebro entre los diferentes grupos empelando un FDR del 5 al 20% (Apéndice, Tablas 3-11). Para identificar cambios macroestructurales en el cerebro con respecto al fenotipo de comportamiento similar a la ansiedad, inicialmente comparamos los cambios volumétricos cerebrales entre individuos clasificados como CON-A versus CON-NA de cada generación (Apéndice, Tabla 3-4). Precisamente, encontramos que la descendencia F1 CON-A mostró mayor volumen en la corteza piriforme derecha en comparación con la descendencia F1 CON-NA (Apéndice, Tabla 3). No encontramos diferencias significativas en los valores volumétricos del cerebro al comparar la descendencia F2 CON-A frente a la descendencia F2 CON-NA; sin embargo, encontramos un volumen más alto en el caudaputamen, la corteza occipital, la corteza de asociación frontal, la corteza retroesplenial y un volumen más bajo en la amígdala, el tálamo, la corteza somatosensorial primaria, la circunvolución dentada en la descendencia F3 CON-A en comparación con la F3 CON-NA descendencia (Apéndice, Tabla 4).

Posteriormente, identificamos diferencias de volumen en regiones cerebrales específicas al comparar CON-NA frente a CAF-A para las generaciones F1, F2 y F3 (Apéndice, Tabla 5-6). Esta comparación nos permitió determinar el efecto de la exposición prenatal a la dieta CAF sobre la herencia transgeneracional en alteraciones cerebrales macroestructurales. De interés, identificamos que las regiones con mayor incremento de volumen se obtuvieron en la descendencia F1 CAF-A mostrado en el lóbulo cerebeloso 3, tálamo derecho y corteza motora secundaria y menor volumen en la capa CA3 del hipocampo derecho, corteza de asociación frontal izquierda, lóbulo cerebeloso 6 y corteza somatosensorial secundaria izquierda en comparación con la descendencia F1 CON-NA (Apéndice, Tabla 5). No encontramos diferencias significativas en el volumen cerebral que sobrevivan a la corrección FDR al comparar la descendencia F2 CAF-A vs F2 CON-NA. En particular, la descendencia F3 CAF-A mostró cambios importantes con un mayor volumen en el tercer ventrículo, la cópula, la corteza rinal y un menor volumen en la cápsula interna, la corteza retroesplenial y el ventrículo lateral en comparación con la descendencia F3 CON-NA (Apéndice, Tabla 6).

Nuestro análisis también identificó cambios en las regiones cerebrales dictados por la dieta prenatal en aquellos sujetos que mostraron fenotipo similar a la ansiedad y que se heredaron transgeneracionalmente. Inicialmente comparamos el efecto de la dieta prenatal (CON vs CAF) en la descendencia diagnosticada con fenotipo no ansioso (Apéndice, Tabla 7-8). Encontramos que, en contraste con la descendencia F1 no ansiosa expuesta a la dieta de control (F1 CON-NA), la descendencia F1 no ansiosa expuesta a la dieta CAF (F1 CAF-NA) mostró un mayor volumen en el lóbulo cerebeloso 3, bulbo olfativo derecho e hipotálamo derecho, mientras que menor volumen en la corteza infralímbica izquierda, la sustancia negra izquierda, la corteza somatosensorial secundaria izquierda y el tálamo derecho (Apéndice, Tabla 7). Por otro lado, no encontramos diferencias significativas que sobrevivan a la corrección FDR en una región específica del cerebro al comparar la descendencia F2 CAF-NA frente a la descendencia F2 CON-NA. Además, la descendencia F3 CAF-NA exhibió mayor volumen en el tercer ventrículo, hipotálamo, lóbulo paramedial y menor volumen en el cuerpo calloso y sustancia blanca asociada, región subincular, cápsula interna, en comparación con la descendencia F3 CON-NA (Apéndice, Tabla 8). Finalmente, comparamos el efecto de la exposición a la dieta prenatal (CON vs CAF) en descendencia diagnosticada con fenotipo ansioso (Apéndice, Tabla 9-11). En contraste con la descendencia F1 ansiosa expuesta a la dieta de control (F1 CON-A), la descendencia F1 ansiosa expuesta a la dieta CAF (F1 CAF-A) mostró un mayor volumen en el lóbulo cerebeloso 3, la corteza somatosensorial primaria derecha y la amigdaloide derecha. y menor volumen en la corteza piriforme derecha, la capa CA3 del hipocampo derecho, la corteza de asociación frontal izquierda, la amígdala y la sustancia gris periacueductal (Apéndice, Tabla 9). Por otro lado, la descendencia F2 CAF-A mostró cambios volumétricos cerebrales donde se encontró un mayor volumen en el hipotálamo derecho, el lóbulo paramediano, la corteza somatosensorial secundaria y un menor volumen cerebral en el ventrículo lateral y la circunvolución dentada derecha en comparación con la descendencia F2 CON-A (Apéndice, Tabla 10). Además, la descendencia F3 CAF-A mostró un mayor volumen en el lóbulo paramedial, la corteza somatosensorial primaria, el área amigdalina, mientras que un volumen menor en el área amigdaloide, la cápsula interna, el lóbulo cerebeloso 4 y 5 en comparación con la descendencia F3 CON-A (Apéndice, Tabla 11).



Figura 15. Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F1. A) Comparación entre sujetos ansiosos control, B) no ansiosa cafetería, C) ansiosos cafetería, D) no ansiosa cafetería contra sujetos no ansiosos control. Por otro lado, se encontró diferencias de volumen entre E) sujetos ansioso cafetería comparados contra sujetos ansiosos control. Azul-azul celeste = menor volumen, rojo-amarillo = mayor volumen. Resultados son significativos a FDR del 5 al 20%.





# 7.2.2 La descendencia programada por dieta cafetería muestra alteración de volumen en regiones específicas identificadas por MBD en cada generación de descendencia relacionado a su fenotipo

Para comparar la magnitud del cambio de volumen en las regiones cerebrales de cada grupo, se extrajeron los valores de jacobianos de cada sujeto que reflejan el volumen en ese punto específico y se compararon los grupos de programación y fenotipo (Fig. 17-18). Primero, encontramos un volumen significativamente mayor en el valor jacobiano de la corteza piriforme en F1 CAF-NA y F1 CAF-A en comparación con el grupo F1 CON-NA (Tabla 3; Fig. 17A; F (3,10) =31.32 p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*p= 0.0212; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*p= 0.0419). Además, identificamos un mayor volumen en el pico significativo del lóbulo cerebeloso 3 en F1 CAF-NA y F1 CAF-A en comparación con el grupo F1 CON-NA (Tabla 5; Fig. 17B; F(3,10)=170.9 p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*p= 0.0.0001), mayor volumen en el pico significativo del tálamo en F1 CAF-A en comparación con CAF-NA (Tabla. 5; Fig. 17C; F(3,10)=15.36 p= 0.0005; F1 CAF-NA vs F1 CAF-A \*\*\*p= 0.0006) y CON-NA (Tabla. 5; Fig. 17C; F(3,10)=15.36 p= 0.0005;F1 CAF-NA vs F1 CAF-A \*\*p= 0.0015), y menor volumen en el pico significativo de la capa hipocampal CA3 en F1 CAF-NA y F1 CAF-A comparado con F1 CON-NA (Tabla. 5; Fig. 17D; F(3,10)=47.90 p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*p= 0.0008; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0.0001). A continuación, encontramos un mayor volumen en el pico significativo del lóbulo cerebeloso 3 en F1 CAF-NA y F1 CAF-A en comparación con el grupo F1 CON-NA (Tabla 7; Fig. 17E; F(3,10)=170,9 p= 0,0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001), mayor volumen en el pico del hipotálamo en F1 CAF-NA y F1 CAF- A comparado con el grupo F1 CON-NA (Tabla 7, Fig. 17F; F(3,10)=21.30 p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*p= 0.0008), y menor volumen en el pico de la corteza infralímbica en F1 CAF-NA y F1 CAF-A en comparación con el grupo F1 CON-NA (Tabla 7, Fig. 17G; F(3 ,10)=116.7 p= 0.0001;F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001;F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001). Posteriormente, encontramos un mayor volumen en el pico significativo del lóbulo cerebeloso 3 en F1 CAF-NA y F1 CAF-A en comparación con el grupo F1 CON-NA (Tabla. 11, Fig. 17H; F(3,10)=170.9 p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; F1 CON-NA vs F1 CAF-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F1 CON-NA vs F1 CAF-A \*\*\*\*p= 0.0001 ; y sin diferencias significativas en la corteza somatosensorial (Tabla 11, Fig. 17I; F1 CON-NA F1 CAF-NA p= 0,059; F1 CON-NA vs F1 CAF-A p= 0,493) y corteza piriforme (Tabla 11, Fig. 17J F1 CON-NA vs F1 CAF-NA p= 0,1242; F1 CON-NA vs F1 CAF-A p= 0.3642) comparándolos con CAF-NA y CAF-A con CON-NA.

Además, comparamos el jacobiano extraído de los picos significativos de las regiones cerebrales de la generación F2 (Tabla 10). Identificamos un efecto significativo importante al comparar CON-A frente a CAF-A (Tabla 10). Encontramos que la descendencia F2 CAF-A mostró un mayor volumen en el pico del hipotálamo en comparación con F2 CON-NA (Fig. 17K; F (3,38) = 15.19 p = 0.0001; F2 CON-NA vs F2 CAF-A \*\*\* \*p= 0,0001), menor volumen en pico del ventrículo lateral (Fig. 17L; F(3,38)=12,72 p= 0,0001; F2 CON-NA vs F2 CAF-A \*p= 0,0328), y mayor volumen en el pico significativo del lóbulo paramediano (Fig. 17M; F(3,38)=9.35 p= 0.0001; F2 CON-NA vs F2 CAF-A \*\*\* p= 0.0007).



**Figura 17.** Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F1 y F2 tomando en cuenta el fenotipo. Sección coronal representativa que muestra las áreas afectadas que encontramos que aumentan (rojo) o disminuyen (azul) entre las comparaciones. Gráficos de caja y bigote que muestra las diferencias de volumen en una región específica con cambios significativos más altos en el análisis de MBD, mientras que los valores jacobianos de F1 se compararon en A) Pir, B) Lb3, C) Th, D) CA3, E) Lb3, F) HT, G) IL , H) Lb3, I) S1 y J) Pir. Se compararon los valores jacobianos de F2 en K) HT, L) LV y M) PML. Los resultados se expresan como media + SEM, seguido de ANOVA post hoc Tukey. \*p<0,05

Finalmente, comparamos el jacobiano extraído del cerebro con picos significativos de la generación F3 (Fig. 18). Identificamos menor volumen en el pico de caudoputamen en CON-NA, CAF-NA y CAF-A en comparación con el grupo CON-A (Tabla 4), Fig. 18A; F(3,49)=10.85 p= 0.0001; F3 CON-NA vs F3 CON-A \*\*\*\*p= 0,0001; F3 CAF-NA vs F3 CON-A \*\*\*\*p=0,0001; F3 CAF-A vs F3 CON-A \*\*\*\*p=0,0001), mayor volumen en el pico del área amigdaloide en CON-NA, CAF-NA y CAF-A en comparación con el grupo CON-A (Tabla 4, Fig. 18B; F(3,49)=10.18 p= 0.0001; F3 CON- NA vs F3 CON-A \*\*\*\*p= 0.0001; F3 CAF-NA vs F3 CON-A \*\*\*p= 0.0002; F3 CAF-A vs F3 CON-A \*\*\*\*p=0.0001), y menor volúmen en el pico de la corteza de asociación frontal en CON-NA, CAF-NA y CAF-A en comparación con el grupo CON-A (Tabla 4, Fig. 18C; F(3,49)=8.025 p= 0.0001; F3 CON-NA vs F3 CON-A \*\*\*p= 0,0005; F3 CAF-NA vs F3 CON-A \*\*\*\*p= 0,0001; F3 CAF-A vs F3 CON-A \*\*\*p= 0,001). A continuación, encontramos que CAF-NA y CAF-A mostraron mayor volumen en el pico del tercer ventrículo en comparación con el grupo CON-NA (Tabla 6, Fig. 18D; F(3.49)=11.38 p=0.0001; F3 CAF- NA vs F3 CON-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F3 CAF-A vs F3 CON-NA \*\*\*\*p= 0.0001), mayor volumen en pico de cópula (Tabla 6, Fig. 18E; F(3, 49)=12.37 p= 0.0001; F3 CAF-NA vs F3 CON-NA \*\*p= 0.0022; F3 CAF-A vs F3 CON-NA \*\*\*\*p= 0.0001; F3 CAF-A vs F3 CON-A \* p=0,0178) y CAF-A mostró mayor volumen en el pico de la corteza rinal (Tabla 6, Fig. 18F; F(3,49)=14,17 p=0,0001) en comparación con CON-NA (\*\*\*\*p=0,0001) , CON-A (\*\*\*\*p=0,0001) y CAF-NA (\*\*\*\*p=0,0001). Además, encontramos que CON-A y CAF-NA mostraron un mayor volumen en el pico del tercer ventrículo en comparación con la descendencia CON-NA (Tabla 8, Fig. 18G; F3 CON-A vs CON-NA \*p = 0.0258; F3 CAF-NA vs CON-NA \*\*\*\*p=0,0001) y CAF-A mostraron menor volumen en comparación con los individuos CAF-NA (Tabla 8, Fig. 18G; F3 CAF-

A vs CAF-NA \*p=0,0142 ). Por otro lado, CON-A y CAF-NA mostraron mayor volumen en el pico del hipotálamo en comparación con el grupo CON-NA (Tabla 8, Fig. 18H; F(3,49)=6.257 p=0.0011; F3 CON-A vs CON-NA \*p=0,0307;F3 CAF-NA vs CON-NA \*\*p=0,0012). Por el contrario, CAF-NA mostró menor volumen en el pico del cuerpo calloso en comparación con el grupo CON-NA y CAF-A mostró mayor volumen en comparación con el grupo CAF-NA (Tabla 8, Fig. 181; F(3,49)=9,184) p=0,0001;F3 CON-NA vs CAF-NA \*\*\*\*p=0,0001;F3 CAF-NA vs CAF-A \*p=0,0462). Además, encontramos diferencias significativas en el volumen del pico del lóbulo paramediano entre los grupos (Tabla 11, Fig. 18J; F(3,49)=12.03 p=0.0001), donde CAF-NA y CAF-A mostraron mayor volumen en comparación con el grupo CON-A (Tabla 11, Fig. 18J; F3 CAF-NA vs F3 CON-A \*\*\*\*p=0,0001; F3 CAF A vs F3 CON A \*\*\*\*p=0,0001), y solo CAF -A mostró mayor volumen en comparación con el grupo CON-NA (Tabla 11, Fig. 18J; F3 CAF-A vs F3 CON-NA \*p=0.0223) y CON-A mostró menor volumen en comparación con el grupo CON-NA (Fig. 18J: F3 CON-NA frente a F3 CON-A \*\*p=0014). Además, encontramos que CAF-A mostró un mayor volumen en el pico de la corteza somatosensorial en comparación con el grupo CON-A (Tabla 11, Fig. 18K; F (3,49) = 5.07 p = 0.0039; F3 CAF-A vs F3 CON -A \*\*p=0019). Por último, identificamos diferencias significativas en el volumen del pico del área amigdaloide entre los grupos (Tabla 11, Fig. 18L; F(3,49)=8,033 p=0,0002), donde CAF-NA y CAF-A mostraron menor volumen en comparación con Los grupos CON-A (Tabla 11, Fig. 18L; F3 CAF-NA vs F3 CON-A \*\*p=0,0048 y F3 CAF-A vs F3 CON-A \*\*\*p=0,0002) y CAF-A mostraron menor volumen comparado con el grupo CON-NA (Fig. 18L; F3 CON-NA vs F3 CAF-A\*p=0.0110).



**Figura 18**. Resultados principales del análisis por morfometría basado en deformación de la generación F3 tomando en cuenta el fenotipo. Sección coronal representativa que muestra las áreas afectadas que encontramos que aumentan (rojo) o disminuyen (azul) entre comparación. Diagrama de caja que muestra las diferencias de volumen en una región específica con cambios significativos más altos en el análisis MBD, mientras que los valores jacobianos de F3 se compararon en A) CPu, B) Amy, C) FrA, D) 3V, E) cópula, F) RCx, G) 3V, H) HT, I) CC, J) PML, K) S1 y L) Amy. Los resultados se expresan como media + SEM, seguido de ANOVA post hoc Tukey. \*p<0,05.

Estos resultados confirman la herencia transgeneracional de alteraciones macroestructurales en la descendencia expuesta a dieta alta en energía que se correlaciona con un comportamiento similar a la ansiedad.

### 7.2.3 La descendencia expuesta a dieta cafetería exhibe alteración microestructural cerebral relacionada con el fenotipo de ansiedad hasta la generación F3

En esta parte del proyecto analizamos los cambios microestructurales en el cerebro empleando diferencias en la anisotropía fraccional, difusión axial, coeficiente de difusión aparente y difusión radial. Inicialmente, los mapas de FA de la descendencia F1 expuesta prenatalmente a dieta cafetería no mostró diferencias significativas en cada región de interés comparados con el grupo control (Apéndice, Tabla 12). Con respecto a la generación de F2, el grupo F2 CAF NA mostró un aumento significativo en el hipocampo derecho (Tabla 13, Fig. 19; F(3,12) = 3,79, p=0,04) en comparación con el grupo F2 CON NA (Fig. 19; F2 CON NA vs F2 CAF NA \*p = 0.048). En particular, se encontraron cambios importantes en los mapas de FA en la descendencia F3 según la exposición de la dieta prenatal (Tabla 13; Fig. 19C, F (3, 22) = 6.983, p = 0.001). En específico, la descendencia F3 CAF-A mostró aumento en el valor de FA de la amígdala derecha en comparación con la descendencia F3 CON-NA (Fig. 19C; \*\*p = 0.0028), con la descendencia F3 CON-A (Fig. 19C; \*p = 0.018) o con la descendencia F3 CAF-NA (Fig. 19C; \*\*p = 0,007). La descendencia F3 CAF-A también mostró un aumento significativo en el valor de ADC en el cuerpo calloso izquierdo (Tabla 16; Fig. 19D; F(3, 27) = 3,011, p = 0.047) en comparación con la descendencia F3 CON-NA (Figura 19D;\*p = 0.034).

De manera similar, la descendencia F3 CAF-A también mostró un aumento significativo en el valor AD de la amígdala derecha F3 (Tabla 13; Fig. 19E; F (3, 22) = 4.452, p = 0.013) con respecto a la descendencia F3 CON-NA (Fig. 19E; \*0.015) y a la descendencia F3 CAF-NA (Fig. 19E; \*p = 0.022). Finalmente, se encontró un aumento significativo en el valor de AD en el hipocampo izquierdo de la descendencia F3 CAF-A (Tabla 19; 12F; F(3, 26) = 3.806, p = 0.021) cuando se comparó con respecto a la descendencia F3 CAF-NA (Fig. 19F; \*p = 0,013).



Figura 19. Resultados principales del análisis de imágenes de resonancia de imagen basados en difusión de las regiones de interés de la generación F2 y F3 tomando en cuenta el fenotipo. Comparación de los valores de anisotropía fraccional, coeficiente de difusión aparente y difusividad axial en las regiones de interés con mayores cambios significativos derivados del análisis de morfometría basado en deformación (Amy=Amígdala, CC=cuerpo calloso e hpp=hipocampo). A) Mapa vectorial representativo que muestra las áreas de las que extrajimos la métrica de difusión FA, AD y ADC. Se realizaron diagramas de caja que muestran diferencias en F2 B) FA en Hpp derecho y comparativos en F3 en C) FA en Amy derecho, D) ADC en CC, E) AD en Amy derecho y F) AD en Hpp izquierdo. Los resultados se expresan como media + SEM, seguido de ANOVA post hoc Tukey. \*p<0,05.

# 7.3 La descendencia expuesta a dieta cafetería exhibe alteración morfológica cerebral

En esta última parte del proyecto estudiamos los cambios microestructurales en el cerebro de la descendencia F1 empleando técnicas histológicas para identificar alteraciones en los marcadores de sinapsis y células glía. Los resultados mostraron que empleando la tinción H&E del hipocampo, se identificó una disminución en el número total de núcleos celulares, células picnóticas, condensación de cromatina y desorganización celular en el giro dentado (DG) de las descendencias prenatalmente expuestas a la dieta CAF (Fig. 20 A y B;  $F_{2,9} = 5.978$ , p = 0.0223).



**Figura 20.** Análisis de la tinción H&E en DG. Imagen representativa de cortes coronales de cerebro que comparan la celularidad DG de los grupos Control y CAF-CTRL (400 y 1000 aumentos). Los resultados se expresan como media + SEM. seguido por ANOVA post hoc Tukey \* p<0.05 vs el grupo control, n=4 por grupo).

Por otro lado, se identificaron defectos de marcadores sinápticos en regiones implicadas en el fenotipo ansioso de la descendencia F1 prenatalmente expuesta a la dieta cafetería. Los resultados del análisis de las imágenes inmunohistoquímicas del DG, mostraron que la descendencia CAF presenta un incremento significativo de la expresión de la proteína acida fibrilar glial (GFAP) en el DG (Fig. 21A-C; F2,6 = 44.82, p = 0.0002), CA1 (Fig. 21D–F; H(2) = 7.318, p = 0.0043, \*p = 0.0206) and CA3 (Fig. 21G–I; H(2) = 7.2, p = 0.0036, \*p = 0.0219) con respecto a su control.



**Figura 21.** Análisis de imágenes de inmunohistoquímica con marcador GFAP en hipocampo. Inmunotinción de las secciones con anticuerpos anti-GFAP del giro dentado *A*–*C*, *CA1 D*–*F y CA3 G-I de las regiones del hipocampo*.

Finalmente, se encontró una disminución significativa en el marcador sináptico sinaptofisina en el CA1 (Fig. 22D-F;  $F_{2,4}$  = 35,81, p = 0,0028, CTRL vs CAF-CTRL, p = 0,0074,) y CA3 (Fig. 22G-I;  $F_{2,4}$  = 44,98, p = 0,0018, CTRL-CTRL frente a CAFCTRL, p = 0,0032) del hipocampo en la descendencia F1 de madres expuestas a la dieta CAF en comparación con el control.



Figura 22. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica con marcador SYP en hipocampo. Inmunotinción de las secciones con anticuerpos anti-SYP del giro dentado A–C, CA1 D–F y CA3 G-I de las regiones del hipocampo.

### **CAPITULO 8**

### DISCUSIÓN

La sobrenutrición materna con dietas con alto contenido energético durante el embarazo es un factor de riesgo de morbilidad neuropsiquiátrica a largo plazo afectando el comportamiento de la descendencia, con susceptibilidad de desarrollar ansiedad (Edlow, 2018), anhedonia (Grillo & Reagan, 2015), adicción (Camacho et al., 2017; Cruz-Carrillo et al., 2020) y autismo (Maldonado-Ruiz et al., 2022; Veniaminova et al., 2017). Sin embargo, los mecanismos neurobiológicos que favorecen dichas alteraciones a través de las generaciones no están completamente estudiados. En este estudio identificamos que la programación materna por exposición a la dieta cafetería causa un comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia y esta condición se transmite a las siguientes dos generaciones. Los cambios en el comportamiento correlacionan con la alteración neuroanatómica cerebral que muestra diferencias de volumen en varias regiones del cerebro relacionadas con el comportamiento de ansiedad resaltando al hipocampo CA3 y la amígdala. Esta evidencia propone que la exposición materna a dietas con alto valor energético promueve cambios de volumen cerebral que heredan se transgeneracionalmente y se asocian con la presencia de fenotipo similar a la ansiedad en la descendencia.

Una contribución importante de este estudio propone que la exposición a la dieta prenatal como desencadenante de la herencia transgeneracional del comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia. De acuerdo con la literatura (Aiken & Ozanne, 2013), nuestros resultados muestran que el efecto de la programación materna sobre la

conducta similar a la ansiedad se manifiesta en generaciones posteriores sin que en ellas se expongan a la dieta, un evento que se conoce como programación prenatal de la conducta. La programación prenatal por desnutrición fue reportada originalmente en la hambruna ocurrida durante la Segunda Guerra Mundial y Overkalix (Susser, 1996). Estudios iniciales confirmaron que la desnutrición prenatal humana predispone a alteraciones metabólicas e incrementa la susceptibilidad a presentar insuficiencia cardíaca, obesidad, diabetes tipo 2 y esquizofrenia en los descendientes F1 después del nacimiento (Barker, 1990; Reisinger et al., 2015; Susser, 1996; Van den Bergh et al., 2020). A partir de aquellas investigaciones, los estudios preclínicos confirmaron que la exposición prenatal a dietas ricas en energía es un factor de riesgo de trastornos neuropsiquiátricos a largo plazo en la descendencia. Nuestros datos confirmaron que las crías F1 expuestas prenatalmente a dietas altas en energía desarrollaron un comportamiento similar a la ansiedad más exacerbado después del nacimiento, mostrando más tiempo en las orillas y menos tiempo en el centro de la arena de campo abierto, además de un aumento en el tiempo para alcanzar el pellet de alimento durante la prueba de alimentación novedosa suprimida y menos tiempo de ubicación en los brazos cerrados durante la prueba del laberinto elevado. Todos estos rasgos conductuales concuerda con reportes anteriores de diagnóstico de ansiedad en modelos murinos (Neuhaus et al., 2020; Peleg-Raibstein et al., 2012; Sasaki et al., 2014; Sharma & Fulton, 2013; Winther et al., 2018). En particular, los rasgos de ansiedad encontrados en la descendencia F1 se heredaron inter y transgeneracionalmente a las generaciones F2 y F3, respectivamente, lo que muestra un mayor tiempo para alcanzar el pellet de alimento durante la prueba de alimentación novedosa suprimida y menos tiempo de estancia en los brazos cerrados durante la prueba del laberinto elevado. Si bien algunos rasgos de ansiedad parecen perderse durante la herencia transgeneracional en la generación F3, las ratas aún conservaron el diagnóstico del comportamiento similar a la ansiedad. Se ha identificado que el comportamiento similar a la ansiedad muestra un aumento del tiempo para alcanzar el pellet de alimento en la prueba de alimentación con supresión de novedad en un modelo animal de estrés leve e impredecible crónico (Jiang et al., 2018) y menos tiempo en brazos cerrados en la prueba de laberinto elevado en modelos de obesidad inducidos por dieta (Belovicova et al., 2017; M. Lin et al., 2018). Nuestros resultados evidenciaron el efecto de la exposición prenatal a dietas altas en energía que establecen la herencia inter y transgeneracional del comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia.

Para explicar el efecto de la programación materna ejercido por la exposición a dieta de cafetería sobre el fenotipo del comportamiento similar a la ansiedad, inicialmente enfocamos nuestro estudio en las alteraciones cerebrales identificadas por imagen de resonancia magnética. Los defectos en la estructura se han propuesto como marcas de trastornos neuropsiquiátricos en sujetos con ansiedad (McIlwrath et al., 2020), mostrando un volumen cerebral más bajo dentro de la zona del hipocampo (Cross, Sarah J. Linker, Kay E. Leslie, 2016; Merz et al., 2018), y mayor volumen en la amígdala (McIlwrath et al., 2020). Además, diferentes estudios han reportado menores volúmenes de la amígdala en jóvenes con una mezcla de trastornos de ansiedad (Mueller et al., 2013; Strawn et al., 2015). De acuerdo a esto, estudios clínicos han evidenciado alteraciones volumétricas del hipocampo y la amígdala asociadas con un estado de ansiedad en pacientes humanos (Lee et al., 2021; X. Li et al., 2019; Modi et al., 2013; X. Zhang et al., 2022), mientras que otros estudios han reportado mayores volúmenes de la amígdala en jóvenes con trastorno generalizado de ansiedad (De Bellis et al., 2000).

Por su parte, evidencias preclínicas han reportado que ratones expuestos prenatalmente a dietas de alta energía también exhibieron cambios de volumen en la amígdala medial y el prosencéfalo basal en la descendencia F1 (Fernandes et al., 2021), lo que confirma los hallazgos clínicos actuales. Anteriormente, nuestro grupo de trabajo reportó reducción de volumen en el núcleo accumbens (NAc), el hipocampo y la corteza prefrontal de ratas diagnosticadas con un comportamiento similar a la depresión que fueron expuestas prenatalmente a dietas altas en energía (Trujillo-Villarreal et al., 2021). En este estudio, confirmamos que la exposición a la dieta cafetería decreció el volumen de la capa CA3 del hipocampo y aumentó el volumen de la amígdala de las generaciones F1, F2 y F3 y que presentaron una conducta similar a la ansiedad en comparación con los de dieta control. Además, las diferencias de volumen son evidentes también entre los grupos de la generación F1 CON clasificados como ansiosos y sujetos F1 CAF clasificados como ansiosos. De manera no esperada, el efecto de la programación fetal por dieta de cafetería y los cambios estructurales en la amígdala e hipocampo no se observan en la generación F2 pero si en la F3 de sujetos ansiosos, confirmando la herencia transgeneracional.

El hipocampo es tradicionalmente investigado en el contexto de navegación espacial, mapeo cognitivo y deterioro en la memoria, sin embargo, también tiene una estrecha relación con el desarrollo de conducta de tipo ansiedad (Bach et al., 2019; Calhoon & Tye, 2015). Estudios recientes han explorado la contribución de las regiones de la amígdala e hipocampo en conductas asociadas a la ansiedad, donde han declarado que alteraciones en hipocampo esta más relacionado a tener un impacto en la toma de decisiones para alcanzar una recompensa bajo amenaza, mientras que alteraciones en amígdala está relacionado a una reducción de vigor después de la aproximación de la amenaza (Bach et al., 2019).

Estudios de resonancia magnética de cerebro completo empleando morfometría basado en voxel, han identificado que pacientes con trastorno de ansiedad social (SAD) presentan menor volumen de sustancia gris en la región de la amígdala comparado con sujetos sanos (Jayakar et al., 2020; Y. Meng et al., 2013). Dentro de los estudios que también han adoptado un enfoque basado en región de interés (ROI), hay algunos que no reportan diferencias relacionadas con la ansiedad social y el volumen de la amígdala (Bas-Hoogendam, 2019; Bas-Hoogendam et al., 2018). Sin embargo, la interpretación adicional de los hallazgos de estos estudios se complica por sus muestras únicas (p. Ej., Familias multigeneracionales con una predisposición genética para SAD) (Bas-Hoogendam et al., 2018), enfoque de ROI compuesto (p. Ej., El ROI de amígdala-hipocampo consistió en de vóxeles bilateralmente en la amígdala, el hipocampo y las circunvoluciones parahipocampales anterior y posterior)(Bas-Hoogendam et al., 2017), y la naturaleza post hoc de los hallazgos (Jayakar et al., 2020; Kawaguchi et al., 2016). Si bien estos autores no analizaron la descendencia F2 y F3, un artículo reciente reportó deterioro transgeneracional en la plasticidad sináptica del hipocampo y la función cognitiva en las generaciones F1, F2 y F3 en sujetos expuestos al consumo materno de una dieta rica en grasas (C. Lin et al., 2021). Esta evidencia respalda nuestros hallazgos que confirman que la exposición prenatal a dietas altas en energía induce la herencia transgeneracional de alteraciones volumétricas en la capa CA3 del hipocampo y de la amígdala favoreciendo un comportamiento similar a la ansiedad en roedores.

A continuación, establecimos asociaciones entre el efecto de la "dieta" sobre la herencia transgeneracional de la "estructura cerebral" y los "resultados conductuales". Encontramos un efecto significativo de la dieta en la herencia transgeneracional de los cambios de volumen en la capa CA3 del hipocampo derecho, la sustancia blanca del cerebelo y el lóbulo cerebeloso 6 compartido entre los individuos CON-NA vs CAF-A de descendencia F1 y F3. Curiosamente, las regiones que se encuentran en nuestro modelo de programación con un fenotipo ansioso muestran alteraciones en regiones que ya han sido reportadas como parte de los circuitos cerebrales de ansiedad (Lee et al., 2021; X. Li et al., 2019; Modi et al., 2013; X. Zhang et al., 2022). En otras palabras, la programación fetal afecta regiones cerebrales involucradas en circuitos cerebrales que regulan la ansiedad y procesos cognitivos que se conservan hasta la generación F3.

Algunos reportes que justifican las alteraciones del hipocampo y la amígdala en el desarrollo de ansiedad reportan, reducción de volumen en pacientes con ansiedad con antecedente de maltrato (van Velzen et al., 2020) y en un modelo animal de ansiedad (Schoenfeld et al., 2017) y un volumen reducido en la amígdala-hipocampo (Baur et al., 2012; Salokangas et al., 2021). Además, la activación de la amígdala es mayor en pacientes ansiosos en comparación con los controles sanos (Makovac et al., 2018), y se observa decremento en conexiones entre la amígdala y la corteza prefrontal en personas con trastornos de ansiedad generalizada (Yang et al., 2020). Los cambios de volumen estructural en el cerebelo y su efecto sobre la ansiedad son menos claros. Anatómicamente, el cerebelo se comunica con las regiones corticales mediante la proyección a los núcleos cerebelosos profundos, el más grande de los cuales es el núcleo dentado (DN) con proyectos a las sinapsis en el tálamo y luego se proyecta a las cortezas
frontal, motora y parietal, lo que permite que el cerebelo contribuya a todos los flujos de procesamiento de información en la corteza cerebral (Fig. 23) (Perusini & Fanselow, 2015; Schmahmann & Pandya, 1997). Los estudios iniciales mostraron anomalías cerebelosas durante la depresión en personas expuestas a la heroína que califican para ansiedad (W. C. Lin et al., 2012). Además, otro reporte mostró conectividad defectuosa entre el cerebelo y la corteza cerebral en la ansiedad adolescente (Lee et al., 2021). Sin embargo, ningún estudio ha confirmado la herencia transgeneracional de las alteraciones del volumen cerebral en el hipocampo o el cerebelo que se relaciona con la ansiedad en humanos o modelos murinos.



## Circuito cerebelo-tálamo-corteza

*Figura 23. Circuito cerebelo-tálamo corteza: El cerebelo se comunica con las regiones corticales.* 

En su conjunto, en este trabajo propones por primera vez que la exposición a dietas ricas con alto contenido en energía induce la herencia transgeneracional de defectos estructurales de regiones cerebrales implicadas en el comportamiento similar a la ansiedad en ratas.

Finalmente, otro hallazgo importante en el presente estudio es la herencia transgeneracional de la alteración cerebral microestructural inducida por la exposición a una dieta prenatal de alto contenido energético. Empleando un análisis basado en resonancia magnética utilizando imágenes ponderadas por difusión (DWI) para analizar la difusión de agua dependiendo de la microestructura cerebral circundante (Ayling et al., 2012), encontramos que los individuos F2 sin ansiedad nacidos de sujetos F1 expuestos a la dieta CAF (CAF-NA) mostraron mayor FA en la región del hipocampo en comparación con el grupo de control sin ansiedad (CON-NA). Reportes han confirmado disminución de la FA y aumento de la DM en el hipocampo de sujetos con ansiedad (X. Chen et al., 2019). De acuerdo a este resultado, identificamos que la descendencia F3 CAF-A mostró valores más altos de FA y AD en la amígdala derecha en contraste con F3 CON-NA y CAF-NA, un valor más alto de AD en el hipocampo en comparación con sujetos sin ansiedad CAF y un valor más alto de ADC en el cuerpo calloso izquierdo en comparación con CON -NA. Mayor FA en la materia gris se asocia con una menor complejidad de los árboles dendríticos, mientras que una mayor FA en la materia blanca se asocia con una mayor integridad (Juranek et al., 2012). De hecho, un aumento en los valores de FA altera la vía cortical prefrontal ventromedial-amígdala en individuos diagnosticados de ansiedad (Kim & Whalen, 2009). Por el contrario, un estudio inicial de DTI confirmó una mayor conexión entre la corteza prefrontal medial derecha y el cuerpo calloso en individuos ansiosos evidenciada por un aumento en los valores de FA (Ayling et al., 2012). Aunque el deterioro de la materia blanca a menudo se asocia con una FA más baja, una propuesta potencial podría sugerir que los valores elevados de FA encontrados en la descendencia F3 CAF-A, como se informó anteriormente, el aumento de FA puede ser un signo de neuroinflamación, también puede ser causado por una mayor mielinización, axonal daño estructural, o disminución del diámetro axonal (Sengul et al., 2019). Finalmente, Vega-Torres et al. (2018) encontraron que la exposición a una dieta obesogénica durante la adolescencia conduce a un comportamiento similar al de la ansiedad con una mayor conectividad estructural entre la mPFC y la amígdala (Vega-Torres et al., 2018).

## **CAPITULO 9**

## CONCLUSIÓN

- La programación fetal materna por dieta hipercalórica favorece la conducta de tipo ansiosa en los hijos que se transmite hasta los bisnietos en ratas wistar
- La exposición a dieta con alto contenido energético induce cambios de volumen en la descendencia en amígdala, lóbulo cerebelar 3, corteza de asociación frontal, hipocampo e hipotálamo.
- El fenotipo ansioso observado en sujetos con programación fetal se asocia a los cambios de volumen y difusión en amígdala, hipocampo y cuerpo calloso.
- La programación fetal por dieta hipercalórica promueve cambios morfológicos cerebrales que pudieran estár implicados en las alteraciones estructurales.

Nuestros hallazgos sugieren por primera vez que la exposición prenatal a una dieta alta en energía programa a la herencia transgeneracional del comportamiento similar a la ansiedad con cambios cerebrales estructurales y de difusión en regiones cerebrales relacionadas con la neurobiología de la ansiedad. Proponemos que las anomalías estructurales en el cerebelo, el hipotálamo, la amígdala y el hipocampo hasta la generación F3 podrían estar involucradas en la herencia del comportamiento similar a la ansiedad.

## REFERENCIAS

- Abrams, D. A., Lynch, C. J., Cheng, K. M., Phillips, J., Supekar, K., Ryali, S., Uddin, L. Q., & Menon, V. (2013). Underconnectivity between voice-selective cortex and reward circuitry in children with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12060–12065. https://doi.org/10.1073/pnas.1302982110
- Aiken, C. E., & Ozanne, S. E. (2013). Transgenerational developmental programming. 0(0), 1–13. https://doi.org/10.1093/humupd/dmt043
- American Psychiatric Association. (2013a). *Diagnostic and Statistical Manual of* Mental Disorders (5th ed.). American Psychiatric Press.
- 4. American Psychiatric Association. (2013b). Diagnostic and Statistical Manual of

Mental Disorders (DSM- 5) (America Psychiatric Association (Ed.); 5th ed.).

- Anand, A., Li, Y., Wang, Y., Lowe, M. J., & Dzemidzic, M. (2009). Resting state corticolimbic connectivity abnormalities in unmedicated bipolar disorder and unipolar depression. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 171(3), 189–198. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2008.03.012
- Andreescu, C., & Lee, S. (2020). Anxiety Disorders. In Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 1191). https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\_28
- Ayling, E., Aghajani, M., Fouche, J. P., & Van Der Wee, N. (2012). Diffusion tensor imaging in anxiety disorders. *Current Psychiatry Reports*, 14(3), 197–202. https://doi.org/10.1007/s11920-012-0273-z
- Babaev, O., Chatain, C. P., & Krueger-Burg, D. (2018). Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4). https://doi.org/10.1038/S12276-018-0063-8
- Bach, D. R., Hoffmann, M., Finke, C., Hurlemann, R., & Ploner, C. J. (2019). Disentangling hippocampal and amygdala contribution to human anxiety-like behavior. *Journal of Neuroscience*, 39(43), 8517–8526. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0412-19.2019
- Bae, J. N., MacFall, J. R., Krishnan, K. R. R., Payne, M. E., Steffens, D. C., & Taylor, W. D. (2006). Dorsolateral Prefrontal Cortex and Anterior Cingulate Cortex White Matter Alterations in Late-Life Depression. *Biological Psychiatry*, 60(12), 1356–1363. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.052
- Balderston, N. L., Vytal, K. E., O'Connell, K., Torrisi, S., Letkiewicz, A., Ernst,
   M., & Grillon, C. (2017). Anxiety Patients Show Reduced Working Memory

Related dIPFC Activation During Safety and Threat. *Depression and Anxiety*, 34(1), 25–36. https://doi.org/10.1002/da.22518

- Bale, T. L. (2015). Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews. Neuroscience*, *16*(6), 332–344. https://doi.org/10.1038/nrn3818
- Bandelow, B., & Michaelis, S. (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 327. https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/BBANDELOW
- Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J. S., Wing, E. E., Morofuji, Y., Cook, D. G., & Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 223. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1
- 15. Barazzoni, R., Cappellari, G. G., Semolic, A., Ius, M., Mamolo, L., Dore, F., Giacca, M., Zanetti, M., Vinci, P., & Guarnieri, G. (2015). Plasma total and unacylated ghrelin predict 5-year changes in insulin resistance. *Clinical Nutrition*. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.10.002
- 16. Barbara Ferry. (2012). The Amygdala A Discrete Multitasking Manager.
- 17. Barker, D. J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*, 301(6761),
  1111–1111. https://doi.org/10.1136/bmj.301.6761.1111
- Bas-Hoogendam, J. M. (2019). Commentary: Gray Matter Structural Alterations in Social Anxiety Disorder: A Voxel-Based Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 10. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00001

- Bas-Hoogendam, J. M., van Steenbergen, H., Nienke Pannekoek, J., Fouche, J.-P., Lochner, C., Hattingh, C. J., Cremers, H. R., Furmark, T., Månsson, K. N. T., Frick, A., Engman, J., Boraxbekk, C.-J., Carlbring, P., Andersson, G., Fredrikson, M., Straube, T., Peterburs, J., Klumpp, H., Phan, K. L., ... van der Wee, N. J. A. (2017). Voxel-based morphometry multi-center mega-analysis of brain structure in social anxiety disorder. *NeuroImage: Clinical*, *16*, 678–688. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.08.001
- 20. Bas-Hoogendam, J. M., van Steenbergen, H., Tissier, R. L. M., Houwing-Duistermaat, J. J., Westenberg, P. M., & van der Wee, N. J. A. (2018). Subcortical brain volumes, cortical thickness and cortical surface area in families genetically enriched for social anxiety disorder – A multiplex multigenerational neuroimaging study. *EBioMedicine*, *36*, 410–428. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.048
- 21. Baur, V., Hänggi, J., & Jäncke, L. (2012). Volumetric associations between uncinate fasciculus, amygdala, and trait anxiety. *BMC Neuroscience*, 13(1). https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-4
- 22. Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, *10*(1), 40–43. https://doi.org/10.1515/intox-2017-0006
- 23. Ben-Yehuda, H., Matcovitch-Natan, O., Kertser, A., Spinrad, A., Prinz, M., Amit, I., & Schwartz, M. (2019). Maternal Type-I interferon signaling adversely affects the microglia and the behavior of the offspring accompanied by increased sensitivity to stress. *Molecular Psychiatry 2019 25:5*, 25(5), 1050–1067. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0604-0
- 24. Benjamin, S., & Steffens, D. C. (2011). Structural Neuroimaging of Geriatric

Depression. *The Psychiatric Clinics of North America*, *34*(2), 423. https://doi.org/10.1016/J.PSC.2011.02.001

- 25. Blair, K. S., Geraci, M., Smith, B. W., Hollon, N., DeVido, J., Otero, M., Blair, J. R., & Pine, D. S. (2012). Reduced Dorsal Anterior Cingulate Cortical Activity During Emotional Regulation and Top-Down Attentional Control in Generalized Social Phobia, Generalized Anxiety Disorder, and Comorbid Generalized Social Phobia/Generalized Anxiety Disorder. *Biological Psychiatry*, *72*(6), 476–482. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.013
- Breier, B. H., Vickers, M. H., Ikenasio, B. A., Chan, K. Y., & Wong, W. P. S. (2001). Fetal programming of appetite and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 185(1–2), 73–79. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00634-7
- 27. Breton, C. V., Landon, R., Kahn, L. G., Enlow, M. B., Peterson, A. K., Bastain, T., Braun, J., Comstock, S. S., Duarte, C. S., Hipwell, A., Ji, H., LaSalle, J. M., Miller, R. L., Musci, R., Posner, J., Schmidt, R., Suglia, S. F., Tung, I., Weisenberger, D., ... Fry, R. (2021). Exploring the evidence for epigenetic regulation of environmental influences on child health across generations. *Communications Biology 2021 4:1*, 4(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02316-6
- Brown, T. A., Campbell, L. A., Lehman, C. L., Grisham, J. R., & Mancill, R. B. (2001). Current and lifetime comorbidity of the DSM-IV anxiety and mood disorders in a large clinical sample. *Journal of Abnormal Psychology*, *110*(4), 585–599. https://doi.org/10.1037/0021-843X.110.4.585
- 29. Calhoon, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety.

Nature Neuroscience, 18(10), 1394–1404. https://doi.org/10.1038/nn.4101

- 30. Camacho, A., Montalvo-Martinez, L., Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., & Garza-Ocañas, L. (2017). Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in offspring. *Behavioural Brain Research*, 330(March), 46–55. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.014
- 31. Campbell, S., Marriott, M., & Macqueen, G. M. (2004). Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering From Depression: A Meta-Analysis. (Am J Psychiatry, 161, 598–607.
- 32. Capuron, L., Pagnoni, G., Drake, D. F., Woolwine, B. J., Spivey, J. R., Crowe, R. J., Votaw, J. R., Goodman, M. M., & Miller, A. H. (2012). Dopaminergic mechanisms of reduced basal ganglia responses to hedonic reward during interferon alfa administration. *Archives of General Psychiatry*, 69(10), 1044–1053. https://doi.org/10.1001/ARCHGENPSYCHIATRY.2011.2094
- 33. Cárdenas-Tueme, M., Montalvo-Martínez, L., Maldonado-Ruiz, R., Camacho-Morales, A., & Reséndez-Pérez, D. (2020). Neurodegenerative Susceptibility During Maternal Nutritional Programing: Are Central and Peripheral Innate Immune Training Relevant? *Frontiers in Neuroscience*, 14(February), 1–12. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00013
- 34. Carlson, J. M., Cha, J., & Mujica-Parodi, L. R. (2013). Functional and structural amygdala Anterior cingulate connectivity correlates with attentional bias to masked fearful faces. *Cortex*, 49(9), 2595–2600. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2013.07.008
- 35. Cazettes, F., Cohen, J. I., Yau, P. L., Talbot, H., & Convit, A. (2011). Obesity-

mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake.BrainResearch,1373,101–109.https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.12.008

- 36. Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2008). Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming: Increased Proliferation of Hypothalamic Peptide-Producing Neurons That Increase Risk for Overeating and Obesity. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 12107–12119. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008
- Chen, G., Guo, Y., Zhu, H., Kuang, W., Bi, F., Ai, H., Gu, Z., Huang, X., Lui, S., & Gong, Q. (2017). Intrinsic disruption of white matter microarchitecture in firstepisode, drug-naive major depressive disorder: A voxel-based meta-analysis of diffusion tensor imaging. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 76, 179–187. https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2017.03.011
- 38. Chen, J., Yan, Y., Yuan, F., Cao, J., Li, S., Eickhoff, S. B., & Zhang, J. (2019). Brain grey matter volume reduction and anxiety-like behavior in lipopolysaccharide-induced chronic pulmonary inflammation rats: A structural MRI study with histological validation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 76, 182– 197. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.020
- Chen, X., Fu, J., Luo, Q., Han, Y., Zheng, Q., Xie, M., & Li, Y. (2019). Altered volume and microstructural integrity of hippocampus in NMOSD. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 28, 132–137. https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.12.009
- 40. Choi, S. H., Shin, J. E., Ku, J., & Kim, J. J. (2016). Looking at the self in front of others: Neural correlates of attentional bias in social anxiety. *Journal of*

Psychiatric Research, 75, 31-40. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.01.001

- 41. Chopra, M., Galbraith, S., & Darnton-Hill, I. (2002). A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(12), 952–958. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571723
- 42. Coloigner, J., Batail, J. M., Commowick, O., Corouge, I., Robert, G., Barillot, C., & Drapier, D. (2019). White matter abnormalities in depression: A categorical and phenotypic diffusion MRI study. *NeuroImage: Clinical*, 22(July 2018). https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101710
- 43. Connolly, C. G., Wu, J., Ho, T. C., Hoeft, F., Wolkowitz, O., Eisendrath, S., Frank, G., Hendren, R., Max, J. E., Paulus, M. P., Tapert, S. F., Banerjee, D., Simmons, A. N., & Yang, T. T. (2013). Resting-State Functional Connectivity of Subgenual Anterior Cingulate Cortex in Depressed Adolescents. *Biological Psychiatry*, *74*(12), 898–907. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.036
- 44. Cortés-Albornoz, M. C., García-Guáqueta, D. P., Velez-Van-meerbeke, A., & Talero-Gutiérrez, C. (2021). Maternal Nutrition and Neurodevelopment: A Scoping Review. *Nutrients*, *13*(10). https://doi.org/10.3390/NU13103530
- 45. Coryell, W., Nopoulos, P., Drevets, W., Wilson, T., & Andreasen, N. C. (2005).
  Subgenual Prefrontal Cortex Volumes in Major Depressive Disorder and Schizophrenia: Diagnostic Specificity and Prognostic Implications. *American Journal of Psychiatry*, 162(9), 1706–1712.
  https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.9.1706
- 46. Craske, M. G., & Stein, M. B. (2016). Anxiety. *The Lancet*, 388(10063), 3048–3059. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30381-6
- 47. Cross, Sarah J. Linker, Kay E. Leslie, F. M. (2016). Abnormal Hippocampal

Structure and Function in Clinical Anxiety and Comorbid Depression. *Physiology* & *Behavior*, *176*(1), 100–106. https://doi.org/10.1002/hipo.22566.Abnormal

- 48. Cruz-Carrillo, G., Montalvo-Martínez, L., Cárdenas-Tueme, M., Bernal-Vega, S., Maldonado-Ruiz, R., Reséndez-Pérez, D., Rodríguez-Ríos, D., Lund, G., Garza-Ocañas, L., & Camacho-Morales, A. (2020). Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 14(June), 1–15. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00452
- 49. Cryan, J. F., & Sweeney, F. F. (2011). Themed Issue: Translational Neuropharmacology-Using Appropriate Animal Models to Guide Clinical Drug Development The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. https://doi.org/10.1111/bph.2011.164.issue-4
- 50. Cunningham, A. M., Walker, D. M., & Nestler, E. J. (2021). Paternal Transgenerational Epigenetic Mechanisms Mediating Stress Phenotypes of Offspring. *The European Journal of Neuroscience*, 53(1), 271. https://doi.org/10.1111/EJN.14582
- De Bellis, M. D., Casey, B. ., Dahl, R. E., Birmaher, B., Williamson, D. E., Thomas, K. M., Axelson, D. A., Frustaci, K., Boring, A. M., Hall, J., & Ryan, N. D. (2000). A pilot study of amygdala volumes in pediatric generalized anxiety disorder. *Biological Psychiatry*, 48(1), 51–57. https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00835-0
- 52. Deng, J., Zhou, F., Hou, W., Silver, Z., Wong, C. Y., Chang, O., Huang, E., & Zuo, Q. K. (2021). The prevalence of depression, anxiety, and sleep disturbances in COVID-19 patients: a meta-analysis. *Annals of the New York Academy of*

Sciences, 1486(1), 90-111. https://doi.org/10.1111/nyas.14506

- 53. Der-Avakian, A., & Markou, A. (2012). The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends in Neurosciences*, 35(1), 68–77. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.005
- 54. Dresler, T., Guhn, A., Tupak, S. V., Ehlis, A. C., Herrmann, M. J., Fallgatter, A. J., Deckert, J., & Domschke, K. (2013). Revise the revised? New dimensions of the neuroanatomical hypothesis of panic disorder. *Journal of Neural Transmission*, 120(1), 3–29. https://doi.org/10.1007/s00702-012-0811-1
- 55. Drevets, W. C., Price, J. L., & Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Structure and Function*, 213(1–2), 93–118. https://doi.org/10.1007/s00429-008-0189-x
- 56. Duman, R. S., Aghajanian, G. K., & Krystal, J. H. (2016). Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med*, 22(3), 238–249. https://doi.org/10.1097/OGX.00000000000256.Prenatal
- 57. Ebeling, U., & Cramon, D. v. (1992). Topography of the uncinate fascicle and adjacent temporal fiber tracts. *Acta Neurochirurgica*, 115(3–4), 143–148. https://doi.org/10.1007/BF01406373
- 58. Edlow, A. G. (2018). Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. *Prenat Diagn*, 37(1), 95–110. https://doi.org/10.1002/pd.4932.Maternal
- 59. Etkin, A., Prater, K. E., Schatzberg, A. F., Menon, V., & Greicius, M. D. (2009). Disrupted Amygdalar Subregion Functional Connectivity and Evidence of a Compensatory Network in Generalized Anxiety Disorder. *Archives of General*

Psychiatry, 66(12), 1361. https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.104

- 60. Felger, J. C., Li, Z., Haroon, E., Woolwine, B. J., Jung, M. Y., Hu, X., & Miller, A. H. (2016). Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. *Molecular Psychiatry*, 21(10), 1358–1365. https://doi.org/10.1038/MP.2015.168
- Felger, Jennifer C. (2018). Imaging the Role of Inflammation in Mood and Anxiety-related Disorders. *Current Neuropharmacology*, 16(5), 533–558. https://doi.org/10.2174/1570159X15666171123201142
- 62. Felger, Jennifer C, & Treadway, M. T. (2017). Inflammation Effects on Motivation and Motor Activity: Role of Dopamine. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 216–241. https://doi.org/10.1038/npp.2016.143
- 63. Feng, S., Zou, L., Wang, H., He, R., Liu, K., & Zhu, H. (2018). RhoA/ROCK-2 Pathway Inhibition and Tight Junction Protein Upregulation by Catalpol Suppresses Lipopolysaccaride-Induced Disruption of Blood-Brain Barrier Permeability. *Molecules*, 23(9), 2371. https://doi.org/10.3390/molecules23092371
- 64. Fernandes, D. J., Spring, S., Roy, A. R., Qiu, L. R., Yee, Y., Nieman, B. J., Lerch, J. P., & Palmert, M. R. (2021). Exposure to maternal high-fat diet induces extensive changes in the brain of adult offspring. *Translational Psychiatry 2021* 11:1, 11(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41398-021-01274-1
- Fitzgerald, P. B., Oxley, T. J., Laird, A. R., Kulkarni, J., Egan, G. F., & Daskalakis,
   Z. J. (2006). An analysis of functional neuroimaging studies of dorsolateral prefrontal cortical activity in depression. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 148(1), 33–45. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2006.04.006

66. Five Things to Know About Inflammation and Depression. (n.d.).

- 67. Franklin, T. B., Linder, N., Russig, H., Thöny, B., & Mansuy, I. M. (2011).
  Influence of Early Stress on Social Abilities and Serotonergic Functions across
  Generations in Mice. *PLOS ONE*, 6(7), e21842.
  https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021842
- Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Grff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological Psychiatry*, 68(5), 408–415. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036
- 69. Fried, E. I., & Nesse, R. M. (2015). Depression is not a consistent syndrome: An investigation of unique symptom patterns in the STAR\*D study. *Journal of Affective Disorders*, 172, 96–102. https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.10.010
- 70. Frodl, T., Bokde, A. L. W., Scheuerecker, J., Lisiecka, D., Schoepf, V., Hampel, H., Möller, H.-J., Brückmann, H., Wiesmann, M., & Meisenzahl, E. (2010).
  Functional Connectivity Bias of the Orbitofrontal Cortex in Drug-Free Patients with Major Depression. *Biological Psychiatry*, 67(2), 161–167. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.022
- 71. Fulton, S., Décarie-Spain, L., Fioramonti, X., Guiard, B., & Nakajima, S. (2022).
  The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 33(1), 18–35.
  https://doi.org/10.1016/J.TEM.2021.10.005
- 72. Gigliucci, V., Gormley, S., Rouine, J., Kerskens, C., Connor, T. J., & Harkin, A. (2014). Characterisation of the antidepressant proper- ties of nitric oxide synthase inhibitors in the olfactory bulbectomised rat model of depres- sion. *European*

Neuropsychopharmacology. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.05.003

- 73. Glover, V., O'Donnell, K. J., O'Connor, T. G., & Fisher, J. (2018). Prenatal maternal stress, fetal programming, and mechanisms underlying later psychopathology - A global perspective. *Development and Psychopathology*, 30(3), 843–854. https://doi.org/10.1017/S095457941800038X
- 74. Godfrey, K. M., & Barker, D. J. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*, 4(2b), 611–624. https://doi.org/10.1079/PHN2001145
- 75. Gotlib, I. H., & Joormann, J. (2010). Cognition and Depression: Current Status and Future Directions. *Annual Review of Clinical Psychology*, 6(1), 285–312. https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.121208.131305
- 76. Grillo, C. A., & Reagan, L. P. (2015). DIETARY RESTRICTION REVERSES OBESITY-INDUCED ANHEDONIA. *Physiol Behav*, 25(8), 713–724. https://doi.org/10.1097/MCA.000000000000178.Endothelial
- 77. Gueye, A. B., Vendruscolo, L. F., de Ávila, C., Le Moine, C., Darnaudéry, M., & Cador, M. (2018). Unlimited sucrose consumption during adolescence generates a depressive-like phenotype in adulthood. *Neuropsychopharmacology, January*, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41386-018-0025-9
- 78. Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137–162. https://doi.org/10.1038/npp.2011.205
- 79. Harrison, N. A., Voon, V., Cercignani, M., Cooper, E. A., Pessiglione, M., & Critchley, H. D. (2016). A Neurocomputational Account of How Inflammation

Enhances Sensitivity to Punishments Versus Rewards. *Biological Psychiatry*, 80(1), 73–81. https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2015.07.018

- Heerwagen, M. J. R., Miller, M. R., Barbour, L. A., & Friedman, J. E. (2010). Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 299*(3), R711–R722. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00310.2010
- Hettema, J. M., Kettenmann, B., Ahluwalia, V., McCarthy, C., Kates, W. R., Schmitt, J. E., Silberg, J. L., Neale, M. C., Kendler, K. S., & Fatouros, P. (2012).
   Pilot multimodal twin imaging study of generalized anxiety disorder. *Depression* and Anxiety, 29(3), 202–209. https://doi.org/10.1002/da.20901
- 82. Hoffman, K. L. (2016). What can animal models tell us about depressive disorders? In *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100099-1.00002-9
- 83. INEGI. (2015). Encuesta Nacional de los Hogares. Salud Mental. http://www.beta.inegi.org.mx/temas/salud/
- 84. Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517(7534), 284–292. https://doi.org/10.1038/NATURE14188
- Jang, J. H. (2021). Principal component analysis of hybrid functional and vector data. *Statistics in Medicine*, 40(24), 5152–5173. https://doi.org/10.1002/sim.9117
- 86. Jayakar, R., Tone, E. B., Crosson, B., Turner, J. A., Anderson, P. L., Phan, K. L., & Klumpp, H. (2020). Amygdala volume and social anxiety symptom severity: Does segmentation technique matter? *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 295(3), 111006. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2019.111006
- 87. Jayatissa, M. N., Henningsen, K., Nikolajsen, G., West, M. J., & Wiborg, O.

(2010). A reduced number of hippocampal granule cells does not associate with an anhedonia-like phenotype in a rat chronic mild stress model of depression. *Stress*, *13*(2), 95–105. https://doi.org/10.3109/10253890902951786

- 88. Jiang, N., Zhang, B. Y., Dong, L. M., Lv, J. W., Lu, C., Wang, Q., Fan, L. X., Zhang, H. X., Pan, R. Le, & Liu, X. M. (2018). Antidepressant effects of dammarane sapogenins in chronic unpredictable mild stress-induced depressive mice. *Phytotherapy Research, January*, 1–7. https://doi.org/10.1002/ptr.6040
- Joaquim, A. O., Coelho, C. P., Motta, P. D., Bondan, E. F., Teodorov, E., Martins, M. F. M., Kirsten, T. B., Casarin, R. C. V., Bonamin, L. V., & Bernardi, M. M. (2017). Transgenerational effects of a hypercaloric diet. *Reproduction, Fertility* and Development, 29(2), 325–335. https://doi.org/10.1071/RD15165
- 90. Johansen, J. P., Hamanaka, H., Monfils, M. H., Behnia, R., Deisseroth, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2010). Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), 12692–12697. https://doi.org/10.1073/pnas.1002418107
- 91. Jokela, M., Hamer, M., Singh-Manoux, A., Batty, G. D., & Kivimäki, M. (2014). Association of metabolically healthy obesity with depressive symptoms: pooled analysis of eight studies. *Molecular Psychiatry*, 19(8), 910–914. https://doi.org/10.1038/MP.2013.162
- 92. Juranek, J., Johnson, C. P., Prasad, M. R., Kramer, L. A., Saunders, A., Filipek, P. A., Swank, P. R., Cox, C. S., & Ewing-Cobbs, L. (2012). Mean diffusivity in the amygdala correlates with anxiety in pediatric TBI. *Brain Imaging and Behavior*, 6(1), 36. https://doi.org/10.1007/S11682-011-9140-5

- 93. Kanner, A. M. (2004). Structural MRI Changes of the Brain in Depression. *Clinical EEG and Neuroscience*, 35(1), 46–52.
  https://doi.org/10.1177/155005940403500111
- 94. Kawaguchi, A., Nemoto, K., Nakaaki, S., Kawaguchi, T., Kan, H., Arai, N., Shiraishi, N., Hashimoto, N., & Akechi, T. (2016). Insular Volume Reduction in Patients with Social Anxiety Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 7. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2016.00003
- 95. Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K. R., Rush, A. J., Walters, E. E., & Wang, P. S. (2003). The Epidemiology of Major Depressive Disorder. *JAMA*, 289(23), 3095. https://doi.org/10.1001/jama.289.23.3095
- 96. Kim, M. J., Hamilton, J. P., & Gotlib, I. H. (2008). Reduced caudate gray matter volume in women with major depressive disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 164(2), 114–122. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2007.12.020

97. Kim, M. J., & Whalen, P. J. (2009). The structural integrity of an amygdalaprefrontal pathway predicts trait anxiety. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(37), 11614–11618. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2335-09.2009

- 98. Koolschijn, P. C. M. P., van Haren, N. E. M., Lensvelt-Mulders, G. J. L. M., Hulshoff Pol, H. E., & Kahn, R. S. (2009). Brain volume abnormalities in major depressive disorder: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Human Brain Mapping*, 30(11), 3719–3735. https://doi.org/10.1002/hbm.20801
- 99. Krishnan, K. R. R. (1992). Magnetic Resonance Imaging of the Caudate Nuclei in

Depression. Archives of General Psychiatry, 49(7), 553. https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820070047007

- Lambert, C., Silva, S. Da, Ceniti, A. K., Rizvi, S. J., Foussias, G., Kennedy,
   S. H., Kennedy, S. H., & Sommer, A. (2018). Anhedonia in depression and schizophrenia : A transdiagnostic challenge. *CNS Neurosci Ther*, 00(00), 1–9. https://doi.org/10.1111/cns.12854
- Lamers, F., van Oppen, P., Comijs, H. C., Smit, J. H., Spinhoven, P., van Balkom, A. J. L. M., Nolen, W. A., Zitman, F. G., Beekman, A. T. F., & Penninx, B. W. J. H. (2011). Comorbidity Patterns of Anxiety and Depressive Disorders in a Large Cohort Study. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 72(03), 341–348. https://doi.org/10.4088/JCP.10m06176blu
- Laving, A. R., Hussain, S. R. A., & Atieno, D. O. (2018). Overnutrition:
   Does complementary feeding play a role? *Annals of Nutrition and Metabolism*, 73(suppl 1), 15–18. https://doi.org/10.1159/000490088
- 103. Lecoutre, S., Petrus, P., Rydén, M., & Breton, C. (2018). Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.07.004
- Lee, Y. J., Guell, X., Hubbard, N. A., Siless, V., Frosch, I. R., Goncalves, M., Lo, N., Nair, A., Ghosh, S. S., Hofmann, S. G., Auerbach, R. P., Pizzagalli, D. A., Yendiki, A., Gabrieli, J. D. E., Whitfield-Gabrieli, S., & Anteraper, S. A. (2021). Functional Alterations in Cerebellar Functional Connectivity in Anxiety Disorders. *Cerebellum*, 20(3), 392–401. https://doi.org/10.1007/s12311-020-01213-8
- 105. Lener, M. S., Kundu, P., Wong, E., Dewilde, K. E., Tang, C. Y.,

Balchandani, P., & Murrough, J. W. (2016). Cortical abnormalities and association with symptom dimensions across the depressive spectrum. *Journal of Affective Disorders*, *190*, 529–536. https://doi.org/10.1016/J.JAD.2015.10.027

- Li, H., Penzo, M. A., Taniguchi, H., Kopec, C. D., Huang, Z. J., & Li, B. (2013). Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nature Neuroscience*, *16*(3), 332–339. https://doi.org/10.1038/nn.3322
- Li, X., Zhang, M., Li, K., Zou, F., Wang, Y., Wu, X., & Zhang, H. (2019).
   The altered somatic brain network in state anxiety. *Frontiers in Psychiatry*, 10(JULY). https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00465
- 108. Li, Y., Zhu, X., Ju, S., Yan, J., Wang, D., Zhu, Y., & Zang, F. (2017). Detection of volume alterations in hippocampal subfields of rats under chronic unpredictable mild stress using 7T MRI: A follow-up study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 46(5), 1456–1463. https://doi.org/10.1002/jmri.25667
- Liao, M., Yang, F., Zhang, Y., He, Z., Su, L., & Li, L. (2014). Lack of gender effects on gray matter volumes in adolescent generalized anxiety disorder. *Journal of Affective Disorders*, 155, 278–282. https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.10.049
- Liao, Y., Huang, X., Wu, Q., Yang, C., Kuang, W., Du, M., Lui, S., Yue, Q., Chan, R., Kemp, G., & Gong, Q. (2013). Is depression a disconnection syndrome? Meta- analysis of diffusion tensor imaging studies in patients with MDD. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 38(1), 49–56. https://doi.org/10.1503/jpn.110180
- 111. Liberman, N., Wang, S. Y., & Greer, E. L. (2019). Transgenerational Epigenetic Inheritance: From Phenomena to Molecular Mechanisms. *Current*

*Opinion in Neurobiology*, *59*, 189. https://doi.org/10.1016/J.CONB.2019.09.012

- Life, L., To, V., & Disorders, A. (2017). Later Life Vulnerability To Stress *Depression* and. 34(6), 791–807.
  https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.06.004.PRENATAL
- Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. (1997).
   The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences, 9(3), 471–481.
   https://doi.org/10.1176/jnp.9.3.471
- Lin, C., Lin, Y. Y., Luo, J., Yu, J. R., Cheng, Y. N., Wu, X. Y., Lin, L., &
  Lin, Y. S. (2021). Maternal High-Fat Diet Multigenerationally Impairs
  Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Male Rat Offspring. *Endocrinology (United States)*. https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa214
- Lin, M., Hou, G., Zhao, Y., & Yuan, T. (2018). Recovery of Chronic Stress-Triggered Changes of Hippocampal Glutamatergic Transmission. 2018, 1–11. https://doi.org/10.1155/2018/9360203
- 116. Lin, W. C., Chou, K. H., Chen, H. L., Huang, C. C., Lu, C. H., Li, S. H., Wang, Y. L., Cheng, Y. F., Lin, C. P., & Chen, C. C. (2012). Structural deficits in the emotion circuit and cerebellum are associated with depression, anxiety and cognitive dysfunction in methadone maintenance patients: A voxel-based morphometric study. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 201(2), 89–97. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2011.05.009
- 117. Lindsay, K. L., Buss, C., Wadhwa, P. D., & Entringer, S. (2018). The interplay between nutrition and stress in pregnancy: implications for fetal programming of brain development. *Biological Psychiatry*. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.06.021

- 118. Liu, X., Jiang, W., & Yuan, Y. (2018). Aberrant Default Mode Network Underlying the Cognitive Deficits in the Patients With Late-Onset Depression. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00310
- Lui, S., Wu, Q., Qiu, L., Yang, X., Kuang, W., Chan, R. C. K., Huang, X., Kemp, G. J., Mechelli, A., & Gong, Q. (2011). Resting-State Functional Connectivity in Treatment-Resistant Depression. *American Journal of Psychiatry*, *168*(6), 642–648. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10101419
- 120. Luna-Munguia, H., Marquez-Bravo, L., & Concha, L. (2021). Longitudinal changes in gray and white matter microstructure during epileptogenesis in pilocarpine-induced epileptic rats. *Seizure*, 90, 130–140. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.02.011
- 121. Macedo, I. C., Rozisky, J. R., Oliveira, C., Oliveira, C. M., Laste, G., Nonose, Y., Santos, V. S., Marques, P. R., Ribeiro, M. F. M., Caumo, W., & Torres, I. L. S. (2015). Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats. *Neuropeptides*, *51*, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.01.002
- Mah, L., Zarate, C. A., Singh, J., Duan, Y.-F., Luckenbaugh, D. A., Manji,
  H. K., & Drevets, W. C. (2007). Regional Cerebral Glucose Metabolic
  Abnormalities in Bipolar II Depression. *Biological Psychiatry*, *61*(6), 765–775.
  https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.06.009
- 123. Makovac, E., Mancini, M., Fagioli, S., Watson, D. R., Meeten, F., Rae, C. L., Critchley, H. D., & Ottaviani, C. (2018). Network abnormalities in generalized anxiety pervade beyond the amygdala-pre-frontal cortex circuit: Insights from graph theory. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 281, 107–116.

https://doi.org/10.1016/J.PSCYCHRESNS.2018.09.006

- Makovac, E., Meeten, F., Watson, D. R., Garfinkel, S. N., Critchley, H. D.,
  & Ottaviani, C. (2016). Neurostructural abnormalities associated with axes of emotion dysregulation in generalized anxiety. *NeuroImage: Clinical*, *10*, 172–181. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.11.022
- 125. Maldonado-Ruiz, R., Trujillo-Villarreal, L. A., Montalvo-Martínez, L., Mercado-Gómez, O. F., Arriaga-Ávila, V., Garza-Ocañas, L., Ortiz-López, R., Garza-Villarreal, E. A., Guevara-Guzmán, R., & Camacho-Morales, A. (2022). MCP-1 Signaling Disrupts Social Behavior by Modulating Brain Volumetric Changes and Microglia Morphology. *Molecular Neurobiology*, *59*(2), 932–949. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02649-7
- 126. Månsson, K. N. T., Carlbring, P., Frick, A., Engman, J., Olsson, C.-J., Bodlund, O., Furmark, T., & Andersson, G. (2013). Altered neural correlates of affective processing after internet-delivered cognitive behavior therapy for social anxiety disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 214(3), 229–237. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2013.08.012
- 127. Marsden, W. N. (2013). Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 43, 168–184. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.12.012
- 128. McIlwrath, S. L., Montera, M. A., Gott, K. M., Yang, Y., Wilson, C. M., Selwyn, R., & Westlund, K. N. (2020). Manganese-enhanced MRI reveals changes within brain anxiety and aversion circuitry in rats with chronic neuropathic painand anxiety-like behaviors. *NeuroImage*, 223(August 2019), 117343. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117343

- Meng, C., Brandl, F., Tahmasian, M., Shao, J., Manoliu, A., Scherr, M., Schwerthöffer, D., Bäuml, J., Förstl, H., Zimmer, C., Wohlschläger, A. M., Riedl, V., & Sorg, C. (2014). Aberrant topology of striatum's connectivity is associated with the number of episodes in depression. *Brain*, *137*(2), 598–609. https://doi.org/10.1093/brain/awt290
- Meng, Y., Lui, S., Qiu, C., Qiu, L., Lama, S., Huang, X., Feng, Y., Zhu,
  C., Gong, Q., & Zhang, W. (2013). Neuroanatomical deficits in drug-naïve adult patients with generalized social anxiety disorder: A voxel-based morphometry study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 214(1), 9–15. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2013.06.002
- 131. Merz, E. C., He, X., & Noble, K. G. (2018). Anxiety, depression, impulsivity, and brain structure in children and adolescents. *NeuroImage: Clinical*, 20(July), 243–251. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.07.020
- Michopoulos, V., Powers, A., Gillespie, C. F., Ressler, K. J., & Jovanovic, T. (2017). Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 254–270. https://doi.org/10.1038/npp.2016.146
- Milaneschi, Y., Simmons, W. K., van Rossum, E. F. C., & Penninx, B. W.
   (2019). Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms.
   *Molecular Psychiatry*, 24(1), 18–33. https://doi.org/10.1038/S41380-018-0017-5
- 134. Miller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., & Felger, J. C. (2013). CYTOKINE TARGETS IN THE BRAIN: IMPACT ON NEUROTRANSMITTERS AND NEUROCIRCUITS. Depression and Anxiety,

30(4), 297-306. https://doi.org/10.1002/da.22084

- Mirabella, F., Desiato, G., Mancinelli, S., Fossati, G., Rasile, M., Morini,
  R., Markicevic, M., Grimm, C., Amegandjin, C., Termanini, A., Peano, C.,
  Kunderfranco, P., di Cristo, G., Zerbi, V., Menna, E., Lodato, S., Matteoli, M., &
  Pozzi, D. (2021). Prenatal interleukin 6 elevation increases glutamatergic synapse
  density and disrupts hippocampal connectivity in offspring. *Immunity*, *54*(11),
  2611-2631.e8. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.006
- 136. Modi, S., Trivedi, R., Singh, K., Kumar, P., Rathore, R. K. S., Tripathi, R. P., & Khushu, S. (2013). Individual differences in trait anxiety are associated with white matter tract integrity in fornix and uncinate fasciculus: Preliminary evidence from a DTI based tractography study. *Behavioural Brain Research*, 238(1), 188–192. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.007
- 137. Montalvo-Martínez, L., Maldonado-Ruiz, R., Cárdenas-Tueme, M., Reséndez-Pérez, D., & Camacho, A. (2018). Maternal Overnutrition Programs Central Inflammation and Addiction-Like Behavior in Offspring. *BioMed Research International*, 2018, 8061389. https://doi.org/10.1155/2018/8061389
- 138. Mueller, S. C., Aouidad, A., Gorodetsky, E., Goldman, D., Pine, D. S., & Ernst, M. (2013). Gray Matter Volume in Adolescent Anxiety: An Impact of the Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism? *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 52(2), 184–195. https://doi.org/10.1016/j.jaac.2012.11.016
- 139. Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoon, G. G., Halbert, S. A., Wichmann, R., Holden, S. S., Mertens, K. L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A. C., Wickersham, I. R., Gray, J. M., & Tye, K. M. (2015). A circuit mechanism for

differentiating positive and negative associations. *Nature*, *520*(7549), 675–678. https://doi.org/10.1038/nature14366

- Neuhaus, Z. F., Gutvirtz, G., Pariente, G., Wainstock, T., Landau, D., & Sheiner, E. (2020). Maternal obesity and long-term neuropsychiatric morbidity of the offspring. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 301(1), 143–149. https://doi.org/10.1007/s00404-020-05432-6
- 141. OECD. (2017). *Obesity Update 2017*. www.oecd.org/health/obesityupdate.htm
- 142. OMS, O. M. de la S. (2016). *Obesidad y Sobrepeso*. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/
- 143. Pantazatos, S. P., Talati, A., Schneier, F. R., & Hirsch, J. (2014). Reduced Anterior Temporal and Hippocampal Functional Connectivity During Face Processing Discriminates Individuals with Social Anxiety Disorder from Healthy Controls and Panic Disorder. and Increases Following Treatment. Neuropsychopharmacology, 425-434. 39(2), https://doi.org/10.1038/npp.2013.211
- Pathak, Y., Salami, O., Baillet, S., & Li, Z. (2016). Longitudinal Changes in Depressive Circuitry in Response to Neuromodulation Therapy. 10(July), 1–11. https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00050
- 145. Peleg-Raibstein, D., Luca, E., & Wolfrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 398–404. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.027
- 146. Penzo, M. A., Robert, V., & Li, B. (2014). Fear conditioning potentiates synaptic transmission onto long-range projection neurons in the lateral subdivision

of central amygdala. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(7), 2432–2437. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4166-13.2014

- Perusini, J. N., & Fanselow, M. S. (2015). Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning & Memory*, 22(9), 417–425. https://doi.org/10.1101/lm.039180.115
- 148. Qiu, L., Lui, S., Kuang, W., Huang, X., Li, J., Li, J., Zhang, J., Chen, H., Sweeney, J. A., & Gong, Q. (2014). Regional increases of cortical thickness in untreated, first-episode major depressive disorder. *Translational Psychiatry*, 4(4), e378–e378. https://doi.org/10.1038/tp.2014.18
- 149. Raison, C L, & Miller, A. H. (2013). The evolutionary significance of depression in Pathogen Host Defense (PATHOS-D). *Molecular Psychiatry*, 18(1), 15–37. https://doi.org/10.1038/mp.2012.2
- Raison, Charles L., Rutherford, R. E., Woolwine, B. J., Shuo, C., Schettler,
   P., Drake, D. F., Haroon, E., & Miller, A. H. (2013). A Randomized Controlled
   Trial of the Tumor Necrosis Factor-alpha Antagonist Infliximab in Treatment
   Resistant Depression: Role of Baseline Inflammatory Biomarkers. *JAMA Psychiatry*, 70(1), 31. https://doi.org/10.1001/2013.JAMAPSYCHIATRY.4
- Rapuano, K. M., Laurent, J. S., Hagler, D. J., Hatton, S. N., Thompson, W. K., Jernigan, T. L., Dale, A. M., Casey, B. J., & Watts, R. (2020). Nucleus accumbens cytoarchitecture predicts weight gain in children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(43), 26977–26984. https://doi.org/10.1073/PNAS.2007918117
- 152. Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., & Pollak, D. D.

(2015). The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology and Therapeutics*, *149*, 213–226. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.001

- 153. Rivera, H. M., Christiansen, K. J., & Sullivan, E. L. (2015). The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 9(194), 1–16. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00194
- 154. Saavedra-Rodríguez, L., & Feig, L. A. (2013). Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. *Biological Psychiatry*, 73(1), 44–53. https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2012.06.035
- 155. Sahebi, A., Nejati-Zarnaqi, B., Moayedi, S., Yousefi, K., Torres, M., & Golitaleb, M. (2021). The prevalence of anxiety and depression among healthcare workers during the COVID-19 pandemic: An umbrella review of meta-analyses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 107(January), 110247. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110247
- 156. Salokangas, R. K. R., Hietala, J., Armio, R. L., Laurikainen, H., From, T., Borgwardt, S., Riecher-Rössler, A., Brambilla, P., Bonivento, C., Meisenzahl, E., Schultze-Lutter, F., Haidl, T., Ruhrmann, S., Upthegrove, R., Wood, S. J., Pantelis, C., Kambeitz-Ilankovic, L., Ruef, A., Dwyer, D. B., ... Koutsouleris, N. (2021). Effect of childhood physical abuse on social anxiety is mediated via reduced frontal lobe and amygdala-hippocampus complex volume in adult clinical high-risk subjects. *Schizophrenia Research*, 227, 101–109. https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2020.05.041
- 157. Santos, M. A. O., Bezerra, L. S., Carvalho, A. R. M. R., & Brainer-Lima,A. M. (2018). Global hippocampal atrophy in major depressive disorder: a meta-

analysis of magnetic resonance imaging studies. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 00(0), 1–10. https://doi.org/10.1590/2237-6089-2017-0130

- 158. Sasaki, A., de Vega, W., Sivanathan, S., St-Cyr, S., & McGowan, P. (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience*, 272, 92–101. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.012
- Satrom, K. M., Ennis, K., Sweis, B. M., Matveeva, T. M., Chen, J., Hanson,
   L., Maheshwari, A., & Rao, R. (2018). Neonatal hyperglycemia induces
   CXCL10/CXCR3 signaling and microglial activation and impairs long-term
   synaptogenesis in the hippocampus and alters behavior in rats. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 82. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1121-9
- 160. Schafer, K. M., Lieberman, A., Sever, A. C., & Joiner, T. (2022). Prevalence rates of anxiety, depressive, and eating pathology symptoms between the pre- and peri-COVID-19 eras: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 298(PA), 364–372. https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.10.115
- Schienle, A., Ebner, F., & Schäfer, A. (2011). Localized gray matter volume abnormalities in generalized anxiety disorder. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 261(4), 303–307. https://doi.org/10.1007/s00406-010-0147-5
- Schmaal, L., Veltman, D. J., Van Erp, T. G. M., Smann, P. G., Frodl, T., Jahanshad, N., Loehrer, E., Tiemeier, H., Hofman, A., Niessen, W. J., Vernooij, M. W., Ikram, M. A., Wittfeld, K., Grabe, H. J., Block, A., Hegenscheid, K., Völzke, H., Hoehn, D., Czisch, M., ... Hibar, D. P. (2016). Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major

Depressive Disorder working group. *Molecular Psychiatry*, 21(6), 806–812. https://doi.org/10.1038/MP.2015.69

- Schmahmann, J. D., & Pandya, D. N. (1997). *The Cerebrocerebellar System* (pp. 31–60). https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60346-3
- Schoenfeld, T. J., McCausland, H. C., Morris, H. D., Padmanaban, V., & Cameron, H. A. (2017). Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biological Psychiatry*, *82*(12), 914–923. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.013
- 165. Seewoo, B. J., Hennessy, L. A., Feindel, K. W., Etherington, S. J., Croarkin, P. E., & Rodger, J. (2020). Validation of chronic restraint stress model in young adult rats for the study of depression using longitudinal multimodal MR imaging. *ENeuro*, 7(4), 1–22. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0113-20.2020
- 166. Sengul, Y., Otcu, H., Ustun, I., Sengul, H. S., Cersonsky, T., Alkan, A., & Louis, E. D. (2019). Neuroimaging depression and anxiety in essential tremor: A diffusion tensor imaging study. *Clinical Imaging*, 58, 96–104. https://doi.org/10.1016/J.CLINIMAG.2019.06.016
- 167. Sharma, S., & Fulton, S. (2013). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International Journal of Obesity*, 37(3), 382–389. https://doi.org/10.1038/ijo.2012.48
- 168. Sheline, Y. I., Price, J. L., Yan, Z., & Mintun, M. A. (2010). Resting-state functional MRI in depression unmasks increased connectivity between networks via the dorsal nexus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 11020–11025. https://doi.org/10.1073/pnas.1000446107

- 169. Sheline, Yvette I. (2011). Depression and the Hippocampus: Cause or Effect? *Biological Psychiatry*, 70(4), 308–309. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.006
- Steele, J. ., & Lawrie, S. . (2004). Segregation of cognitive and emotional function in the prefrontal cortex: a stereotactic meta-analysis. *NeuroImage*, *21*(3), 868–875. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.09.066
- Stein, D. J., Scott, K. M., Jonge, P. De, & Kessler, R. C. (2017).
   Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *19*(2), 127–136.
- Strawn, J. R., Hamm, L., Fitzgerald, D. A., Fitzgerald, K. D., Monk, C. S., & Phan, K. L. (2015). Neurostructural abnormalities in pediatric anxiety disorders. *Journal of Anxiety Disorders*, 32, 81–88. https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2015.03.004
- Strawn, J. R., Wehry, A. M., Chu, W.-J., Adler, C. M., Eliassen, J. C., 173. M. A., Strakowski, S. M., & DelBello, M. P. Cerullo. (2013). ABNORMALITIES NEUROANATOMIC IN **ADOLESCENTS** WITH **GENERALIZED** ANXIETY **DISORDER:** А VOXEL-BASED MORPHOMETRY STUDY. Depression and Anxiety, 30(9), 842-848. https://doi.org/10.1002/da.22089
- Ströhle, A., Gensichen, J., & Domschke, K. (2018). The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(37), 611–620. https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0611
- Susser, E. (1996). Schizophrenia After Prenatal Famine. Archives of General Psychiatry, 53(1), 25.

https://doi.org/10.1001/archpsyc.1996.01830010027005

- 176. The Partnership for Maternal, N. B. and C. H. (2012). Knowledge Summary: Women's & Children's Health, Nutrition.
- 177. Torres, S. J., & Nowson, C. A. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*, 23(11–12), 887–894. https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.08.008
- Tournier, J. D., Smith, R., Raffelt, D., Tabbara, R., Dhollander, T., Pietsch,
  M., Christiaens, D., Jeurissen, B., Yeh, C. H., & Connelly, A. (2019). MRtrix3: A fast, flexible and open software framework for medical image processing and visualisation. In *NeuroImage*. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116137
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(6), 317–331. https://doi.org/10.1038/NRN3945
- 180. Trujillo-Villarreal, L. A., Romero-Díaz, V. J., Marino-Martínez, I. A., Fuentes-Mera, L., Ponce-Camacho, M. A., Devenyi, G. A., Mallar Chakravarty, M., Camacho-Morales, A., & Garza-Villarreal, E. E. (2021). Maternal cafeteria diet exposure primes depression-like behavior in the offspring evoking lower brain volume related to changes in synaptic terminals and gliosis. *Translational Psychiatry*, *11*(1), 53. https://doi.org/10.1038/s41398-020-01157-x
- 181. Trujillo Villarreal, L. A., Cárdenas-Tueme, M., Maldonado-Ruiz, R., Reséndez-Pérez, D., & Camacho-Morales, A. (2020). Potential role of primed microglia during obesity on the mesocorticolimbic circuit in autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, *May*, 1–20. https://doi.org/10.1111/jnc.15141

- 182. Van den Bergh, B. R. H., van den Heuvel, M. I., Lahti, M., Braeken, M., de Rooij, S. R., Entringer, S., Hoyer, D., Roseboom, T., Räikkönen, K., King, S., & Schwab, M. (2020). Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *117*, 26–64. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003
- van Velzen, L. S., Kelly, S., Isaev, D., Aleman, A., Aftanas, L. I., Bauer, J., Baune, B. T., Brak, I. V., Carballedo, A., Connolly, C. G., Couvy-Duchesne, B., Cullen, K. R., Danilenko, K. V., Dannlowski, U., Enneking, V., Filimonova, E., Förster, K., Frodl, T., Gotlib, I. H., ... Schmaal, L. (2020). White matter disturbances in major depressive disorder: a coordinated analysis across 20 international cohorts in the ENIGMA MDD working group. *Molecular Psychiatry*, 25(7), 1511–1525. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0477-2
- 184. Vendruscolo, L. F., Gueye, A. B., Darnaude, M., Ahmed, S. H., & Cador, M. (2010). Sugar Overconsumption during Adolescence Selectively Alters Motivation and Reward Function in Adult Rats. *PLoS ONE*, 5(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009296
- 185. Veniaminova, E., Cespuglio, R., Cheung, C. W., Umriukhin, A., Markova, N., Shevtsova, E., Lesch, K.-P., Anthony, D. C., & Strekalova, T. (2017). Autism-Like Behaviours and Memory Deficits Result from a Western Diet in Mice. *Neural Plasticity*, 2017, 1–14. https://doi.org/10.1155/2017/9498247
- Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., Gluckman,
  P. D., Amiel, S., Caprio, S., Sherwin, R., Plewe, G., Haymond, M., Tamborlane,
  W., Amiel, S., Sherwin, R., Simonson, D., Anderson, E., Mark, A., Barker, D.,

Barker, D., Barker, D., ... Gluckman, P. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *279*(1), E83-7. https://doi.org/10.1210/jcem-72-2-277

- 187. Videbech, P. (2004). Hippocampal Volume and Depression: A Meta-Analysis of MRI Studies. *American Journal of Psychiatry*, 161(11), 1957–1966. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.11.1957
- 188. Weber-Stadlbauer, U. (2017). Epigenetic and transgenerational mechanisms in infection-mediated neurodevelopmental disorders. In *Translational Psychiatry*. https://doi.org/10.1038/tp.2017.78
- 189. Whitton, A. E., Treadway, M. T., & Pizzagalli, D. A. (2016). Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, 28(1), 7–12. https://doi.org/10.1097/YCO.00000000000122.Reward
- 190. WHO. (2018). *Depression*. WHO 2018. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression
- 191. Winther, G., Elfving, B., Müller, H. K., Lund, S., & Wegener, G. (2018).
  Maternal High-fat Diet Programs Offspring Emotional Behavior in Adulthood. *Neuroscience*, 388(July), 87–101.
  https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.014
- Wise, T., Radua, J., Via, E., Cardoner, N., Abe, O., Adams, T. M., Amico,
  F., Cheng, Y., Cole, J. H., Périco, C. de A. M., Dickstein, D. P., Farrow, T. F. D.,
  Frodl, T., Wagner, G., Gotlib, I. H., Gruber, O., Ham, B. J., Job, D. E., Kempton,
  M. J., ... Arnone, D. (2017). Common and distinct patterns of grey-matter volume
alteration in major depression and bipolar disorder: Evidence from voxel-based meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 22(10), 1455–1463. https://doi.org/10.1038/mp.2016.72

- 193. World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates. *World Health Organization*, 1–24. https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 194. XI. An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey's brain. (1888). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)*, *179*, 303–327. https://doi.org/10.1098/RSTB.1888.0011
- 195. Xi, G., Hui, J., Zhang, Z., Liu, S., Zhang, X., Teng, G., Chan, K. C., Wu, E. X., Nie, B., Shan, B., Li, L., & Reynolds, G. P. (2011). Learning and Memory Alterations Are Associated with Hippocampal N-acetylaspartate in a Rat Model of Depression as Measured by 1H-MRS. *PLoS ONE*, 6(12), e28686. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028686
- Yang, C., Zhang, Y., Lu, M., Ren, J., & Li, Z. (2020). White Matter Structural Brain Connectivity of Young Healthy Individuals With High Trait Anxiety. *Frontiers in Neurology*, 10, 1421. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.01421/BIBTEX
- 197. Yksel, C., & Öngür, D. (2010). Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. *Biological Psychiatry*, 68(9), 785–794. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.016
- 198. Zhang, J., Wang, J., Wu, Q., Kuang, W., Huang, X., He, Y., & Gong, Q.
  (2011). Disrupted Brain Connectivity Networks in Drug-Naive, First-Episode
  Major Depressive Disorder. *Biological Psychiatry*, 70(4), 334–342.

https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.018

- Zhang, X., Suo, X., Yang, X., Lai, H., Pan, N., He, M., Li, Q., Kuang, W., Wang, S., & Gong, Q. (2022). Structural and functional deficits and couplings in the cortico-striato-thalamo-cerebellar circuitry in social anxiety disorder. *Translational Psychiatry*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41398-022-01791-7
- Zhao, Y., Chen, L., Zhang, W., Xiao, Y., Shah, C., Zhu, H., Yuan, M., Sun, H., Yue, Q., Jia, Z., Zhang, W., Kuang, W., Gong, Q., & Lui, S. (2017). Gray Matter Abnormalities in Non-comorbid Medication-naive Patients with Major Depressive Disorder or Social Anxiety Disorder. *EBioMedicine*, 21, 228–235. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.06.013
- Zhu, X., Wang, X., Xiao, J., Liao, J., Zhong, M., Wang, W., & Yao, S. (2012). Evidence of a Dissociation Pattern in Resting-State Default Mode Network Connectivity in First-Episode, Treatment-Naive Major Depression Patients. *Biological Psychiatry*, 71(7), 611–617. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.10.035
- 202. Zhu, Y., Qi, S., Zhang, B., He, D., Teng, Y., Hu, J., & Wei, X. (2019). Connectome-Based Biomarkers Predict Subclinical Depression and Identify Abnormal Brain Connections With the Lateral Habenula and Thalamus. 10(June), 1–14. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00371

# APENDICE

### Tabla 3

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON no ansioso vs F1 CON ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
Piriform Cortex	11.93	mayor	6.339599	-2.75051	3.354496

# Tabla 4

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON no ansioso vs F3 CON ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
caudaputamen	5.595	mayor	-4.7604	-8.15051	3.174496
caudaputamen	4.782	mayor	4.719599	-5.45051	5.874496
Frontal Association Cortex	4.388	mayor	1.959599	-12.0505	5.094496
Retrosplenial Cortex	4.363	mayor	-0.6204	-3.83051	8.694496
amygdaloid area	-5.713	menor	3.099599	-6.71051	2.094496
Thalamus	-5.657	menor	-2.4804	-5.93051	5.634496
Primary Somatosensory Cortex	-5.557	menor	5.199599	-7.79051	7.134496
Crus 1 ansiform lobule	-4.797	menor	4.539599	2.829486	7.854496
Corpus Callosum & associated White Matter	-4.456	menor	-3.1404	-2.09051	9.174496
Cerebellar White Matter / Arbor vita of cerebellum	-4.431	menor	-1.8804	4.749486	7.494496
dentate gyrus	-4.263	menor	3.999599	-2.93051	6.774496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON no ansioso vs F1

CAF ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	C	oordenadas	
cerebellar lobule 3	12.31	mayor	-1.2204	-9.95051	8.814496
Thalamus	10.65	mayor	2.859599	2.889486	6.594496

Secondary Motor Cortex	8.471	mayor	5.439599	-11.8105	6.354496
Cerebellar White Matter / Arbor vita of cerebellum	6.733	mayor	-6.4404	-11.2705	4.074496
Hippocampal layer CA3	-13.36	menor	3.459599	-2.45051	1.734496
Frontal Association Cortex	-10.06	menor	0.759599	6.249486	9.834496
cerebellar lobule 6	-9.749	menor	5.679599	-2.99051	8.754496
Secondary Somatosensory Cortex	-8.394	menor	6.399599	-3.05051	3.174496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON no ansioso vs F3 CAF ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
Third ventricle	6.412	mayor	-1.1604	-8.09051	5.874496
Copula	5.872	mayor	-4.4604	4.089486	5.094496
rhinal cortex	5.771	mayor	5.319599	0.069486	4.914496
amygdaloid area	5.13	mayor	-4.7004	-6.89051	1.794496
Hippocampal layer CA3	5.124	mayor	3.219599	-3.95051	2.694496
Cerebellar White Matter / Arbor vita of cerebellum	4 875	mayor	1 239599	4 869486	8 274496
Internal capsule	-5.267	menor	2.559599	-5.39051	3.234496
Retrosplenial Cortex	-5.243	menor	-2.6004	-2.15051	9.954496

Lateral ventricle	-5.098	menor	-4.4604	-5.15051	3.234496
cerebellar lobule 6	-5.086	menor	0.339599	3.729486	9.174496
Cornus Callosum & associated		menor			
White Matter	-5.001	menor	-4.2804	-10.9105	6.054496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON no ansioso vs F1

CAF no ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
cerebellar lobule 3	17.38	mayor	-1.2204	-9.95051	8.814496
Olfactory Bulb	13.91	mayor	0.759599	6.249486	9.834496
hypothalamus	12.35	mayor	0.459599	-2.63051	3.114496
Olfactory Bulb	8.073	mayor	-1.8204	3.909486	3.534496
Infralimbic Cortex	-17.72	menor	-1.6404	2.769486	6.834496
substantia nigra	-13.8	menor	-2.7204	-4.85051	3.234496
Crus 1 ansiform lobule	-12.42	menor	5.439599	-11.8105	6.354496

Thalamus	-10.29	menor	0.699599	-1.67051	6.594496
Secondary Somatosensory	-9.287	menor			
Cortex			-8.1204	-1.25051	6.114496
cerebellar lobule 6	-9.135	menor	0.219599	-12.4705	9.114496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON no ansioso vs F3

CAF no ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
Third ventricle	5.543	mayor	-0.6204	-4.67051	6.234496
hypothalamus	5.035	mayor	0.080401	-8.39051	2.574496
paramedian lobe	4.952	mayor	3.519599	4.149486	6.354496
subincular region	4.921	mayor	5.559599	-2.45051	3.774496
Flocculus	4.678	mayor	-7.4604	2.349486	4.254496
cerebellar lobule 8	4.464	mayor	-1.6404	5.229486	7.014496

<b>Cingulate Cortex area 1</b>	3.952	mayor	0.399599	-12.7105	8.274496
Hippocampal layer CA1	3.872	mayor	-5.5404	-3.17051	4.734496
Corpus Callosum & associated		menor			
White Matter	-5.446		1.059599	-11.3905	5.274496
Corpus Callosum & associated		menor			
White Matter	-5.324		1.899599	-5.09051	9.294496
subicular region	-5.236	menor	-4.9404	-0.29051	7.194496
Internal capsule	-5.223	menor	2.559599	-5.33051	3.294496
Stria terminalis	-5.025	menor	-4.8204	-6.29051	6.474496
Secondary Visual Cortex	-4.586	menor	5.439599	-1.07051	8.874496
¥					
<b>Piriform Cortex</b>	-4.359	menor	-6.4404	-9.11051	2.634496
rhinal cortex	-4.169	menor	6.159599	-1.13051	3.354496
Olfactory Bulb	-4.152	menor	-3.5004	-13.7305	4.674496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F1 CON ansioso vs F1 CAF ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
Cerebellar lobule 3	14.64	mayor	-1.2204	-9.95051	8.814496
Primary Somatosensory Cortex	10.01	mayor	2.859599	2.889486	6.594496
Crus 1 ansiform lobule	9.569	mayor	5.439599	-11.8105	6.354496
Paraflocculus	8.872	mayor	-6.4404	-11.2705	4.074496
amygdaloid area	7.913	mayor	3.459599	-2.45051	1.734496

<b>Olfactory Bulb</b>	7.386	mayor	0.759599	6.249486	9.834496
Primary Somatosensory Cortex	6.901	mayor	5.679599	-2.99051	8.754496
Piriform Cortex	-10.2	menor	6.399599	-3.05051	3.174496
Hippocampal layer CA3	-9.099	menor	3.639599	-5.03051	7.254496
Frontal Association Cortex	-8.177	menor	-1.7004	3.069486	6.894496
amygdala	-8.096	menor	-5.4804	-3.11051	4.074496
Periaqueductal grey	-6.963	menor	-1.6404	-7.67051	5.574496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F2 CON ansioso vs F2 CAF ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
hypothalamus	6.375	mayor	0.279599	-3.65051	4.854496
paramedian lobule	5.264	mayor	2.499599	4.509486	6.654496
Secondary somatosensory		mayor			
cortex	5.11		5.139599	-7.79051	4.434496
left motor cortex	5.015	mayor	-2.2404	-9.71051	8.094496

Corpus Callosum & associated		mayor			
White Matter	4.886	-	1.659599	-6.17051	8.994496
Corpus Callosum & associated		mayor			
White Matter	4.543	•	-3.4404	-3.17051	9.234496
Lateral ventricle	-5.78	menor	-5.1804	-5.03051	4.434496
dentate gyrus	-5.415	menor	3.459599	-6.17051	7.074496

Áreas con cambio de volumen en la comparación entre los grupos F3 CON ansioso vs F3 CAF ansioso.

Región cerebral	t-stat	Cambio de volumen	Coordenadas		
paramedian lobe	6.158	mayor	1.119599	3.549486	6.894496
Primary Somatosensory Cortex	6.048	mayor	5.199599	-7.79051	7.134496
amygdaloid area	5.913	mayor	-3.9804	-6.41051	1.734496

amygdaloid area	5.332	mayor	3.099599	-6.71051	2.094496
	5 0 5 1		5 120500	0.05051	5.014406
rninal cortex	5.251	mayor	5.139599	-0.05051	5.814496
Thalamus	4.729	mayor	-1.4004	-5.15051	6.174496
Frontal Association Cortex	4.72	mayor	2.199599	-11.7505	3.414496
paraflocculus	4.594	mayor	-4.8204	3.309486	5.514496
<b>I</b>		y			
Primary Somatosensory Cortex	4.515	mayor	-3.5604	-9.95051	8.514496
		mayor	5.5001	5150001	0.011190
amvgdaloid area	-5.757	menor	-3.9804	-6.59051	2.514496
Internal capsule	-5.26	menor	3.279599	-6.53051	4.614496
<b>*</b>					
cerebellar lobule 4&5	-5.248	menor	-0.1404	2.889486	9.894496
lateral septum	-5.053	menor	-1.4604	-9.35051	6.594496
<b>Retrosplenial Cortex</b>	-4.671	menor	-0.6204	-3.77051	8.574496
<b>.</b>					
Frontal Association Cortex	-4.536	menor	2.079599	-13.0705	5.514496
Frontal Association Cortex	-4.395	menor	-3.7404	-14.6905	6.774496

### Tabla 12.

Valores de p de la comparación de FA entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F1.

Región	ANOVA	CON-NA VS. CON- A	CON- NA VS. CAF-NA	CON- NA VS. CAF-A	CON-A VS. CAF-NA	CON-A VS. CAF-A	CAF-NA VS. CAF- A
Right corpus callosum	F (3, 18) = 0.4498 P=0.7205	P=0.9268	P=0.8758	P=0.9964	P=0.7282	P=0.8747	P=0.914

Left corpus callosum	F (3, 18) = 1.903 P=0.1654	P=0.8892	P=0.2561	P=0.9312	P=0.3049	P=0.7167	P=0.3967
Fornix	F (3, 18) = 0.05926 P=0.9805	P=0.998	P=0.9999	P=0.9912	P=0.9963	P=0.9866	P=0.9955
Right fimbria	F (3, 16) = 0.2750 P=0.8426	P=>0.9999	P=0.8948	P=0.848	P=0.9792	P=0.972	P=0.9999
Left fimbria	F (3, 16) = 0.6956 P=0.5681	P=>0.9999	P=0.5567	P=0.7961	P=0.8405	P=0.9438	P=0.9348
Right internal capsule	F (3, 18) = 0.06697 P=0.9767	P=0.9728	P=0.9981	P=0.9999	P=0.9862	P=0.9758	P=0.9992
Left internal capsule	F (3, 18) = 0.2723 P=0.8446	P=0.8903	P=0.9909	P=0.9988	P=0.9428	P=0.8431	P=0.9579
Cerebelar lobe 3	F (3, 18) = 0.8419 P=0.4887	P=0.9848	P=0.9852	P=0.7401	P=0.9455	P=0.9983	P=0.4641
Cerebelar lobe 6	F (3, 18) = 0.08256 P=0.9687	P=0.9993	P=0.9823	P=0.9614	P=0.9998	P=0.9992	P=0.9998
Right hippocampus	F (3, 18) = 0.09111 P=0.9640	P=>0.9999	P=0.9842	P=0.9582	P=0.9986	P=0.9964	P=0.9995
Left hippocampus	F (3, 18) = 0.01158 P=0.9982	P=>0.9999	P=0.999	P=0.999	P=0.9994	P=0.9994	P=>0.9999
Right amygdala	F (3, 18) = 0.5352 P=0.6640	P=0.9876	P=0.8516	P=0.9933	P=0.9994	P=0.9629	P=0.6211
Left amygdala	F (3, 15) = 0.5594 P=0.6499	P=0.999	P=0.7289	P=0.9987	P=0.8682	P=0.9952	P=0.7115

Valores de p de la comparación de FA entre el grupo clasificado como sin ansiedad y ansiedad de los grupos de control o cafetería en la descendencia F2

Región	ANOVA	CON-	CON-NA	CON-	CON-A	CON-A	CAF-NA
		NA VS.	VS. CAF-	NA VS.	VS. CAF- NA	VS.	VS. CAF-
Right corpus callosum	F (3, 10) = 0.3877 P=0.7644	P=0.9213	P=0.973	P=0.9063	P=0.8377	P=0.7639	P=0.9966
Left corpus callosum	F (3, 10) = 1.515 P=0.2701	P=0.6416	P=0.9456	P=0.4901	P=0.5073	P=0.2555	P=0.8624
Fornix	F (2, 10) = 0.5416 P=0.5980	NA	P=0.9998	P=0.5947	NA	NA	P=0.6945
Right fimbria	F (3, 12) = 0.8706 P=0.4832	P=0.6183	P=0.9013	P=0.985	P=0.4269	P=0.8476	P=0.8279
Left fimbria	F (3, 12) = 0.9616 P=0.4424	P=0.8009	P=0.6627	P=0.9986	P=0.3916	P=0.9053	P=0.7035
Right internal capsule	F (2, 8) = 0.04783 P=0.9536	NA	P=0.9996	P=0.9591	NA	NA	P=0.9607
Left internal capsule	F (2, 8) = 2.144 P=0.1796	NA	P=0.1889	P=0.9978	NA	NA	P=0.2698
Cerebelar lobe 3		P=0.9703	P=0.698	P=0.7756	P=0.7183	P=0.7645	P=0.9993
Cerebelar lobe 6	F (3, 10) = 0.5295 P=0.6721	P=0.9989	P=0.9931	P=0.7157	P=>0.9999	P=0.8666	P=0.6827

Right hippocampus	F (3, 12) = 3.793 P=0.0401	P=0.9123	P=0.0489*	P=0.5915	P=0.0695	P=0.4589	P=0.5167
Left hippocampus	F (3, 12) = 1.195 P=0.3532	P=0.997	P=0.521	P=0.5361	P=0.6307	P=0.6422	P=>0.9999
Right amygdala	F (3, 6) = 1.307 P=0.3558	P=0.7266	P=0.8038	P=0.652	P=0.4623	P=0.3743	P=0.9945
Left amygdala	F (3, 4) = 4.183 P=0.1003	P=0.1673	P=0.3782	P=0.993	P=0.0802	P=0.3624	P=0.4611

Valores de p de la comparación de FA entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F3

Region	ANOVA	CON-NA	CON-NA	CON-NA	CON-A	CON-A	CAF-NA
		VS. CON-A	VS. CAF- NA	VS. CAF-A	VS. CAF-NA	VS. CAF- A	VS. CAF-A
Right corpus callosum	F(3, 27) = 1.171 P=0.3392	P=0.5791	P=0.9995	P=0.7811	P=0.6249	P=0.2672	P=0.7273
Left corpus callosum	F (3, 27) = 0.9746 P=0.4192	P=0.8114	P=0.9729	P=0.7465	P=0.9292	P=0.4285	P=0.5295
Fornix	F (3, 26) = 0.1673 P=0.9174	P=0.9111	P=>0.9999	P=0.9998	P=0.9127	P=0.9075	P=0.9998
Right fimbria	F (3, 26) = 1.333 P=0.2850	P=0.9253	P=0.1975	P=0.7684	P=0.9457	P=0.6547	P=0.0544
Left fimbria	F (3, 26) = 0.8595 P=0.4744	P=0.956	P=0.99	P=0.8225	P=0.9877	P=>0.9999	P=0.9456
Right internal capsule	F (3, 15) = 1.555 P=0.2417	P=0.4652	P=0.8241	P=0.8472	P=0.7768	P=0.2437	P=0.4414
Left internal capsule	F (3, 11) = 1.198 P=0.3556	P=0.637	P=0.2943	P=0.7079	P=0.9848	P=0.9949	P=0.8842
Cerebelar lobe 3	F (3, 27) = 0.8524 P=0.4775	P=0.8915	P=0.7115	P=0.9189	P=0.5036	P=0.6846	P=0.9937
Cerebelar lobe 6	F (3, 27) = 0.2625 P=0.8518	P=0.9711	P=0.9953	P=0.9284	P=0.9331	P=0.8341	P=0.9761
Right hippocampus	F (3, 26) = 1.478 P=0.2437	P=0.7951	P=0.9764	P=0.3785	P=0.6757	P=0.2765	P=0.6427
Left hippocampus	F (3, 26) = 1.502 P=0.2374	P=0.8624	P=0.7477	P=0.3686	P=0.5528	P=0.3323	P=0.9041
Right amygdala	F (3, 22) = 6.983 P=0.0018	P=0.8859	P=0.9924	P=0.0028**	P=0.8169	P=0.0181*	P=0.0076**

Left	F (3, 15)	P=0.9961	P=0.9619	P=0.8396	P=0.908	P=0.9639	P=0.3622
amygdala	= 0.9691 P=0.4331						

Valores de p de la comparación de ADC entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F1

Región	ANOVA	CON-	CON-	CON-	CON-A	CON-A	CAF-NA
		NA VS.	NA VS.	NA VS.	VS.	VS.	VS. CAF-
Right corpus callosum	F (3, 18) = 2.832 P=0.0675	P=0.2964	CAF-NA P=0.6912	P=0.4806	P=0.1001	CAF-A P=0.0687	A P=0.9941
Left corpus callosum	F (3, 18) = 2.435 P=0.0982	P=0.4991	P=0.5233	P=0.4422	P=0.1541	P=0.1377	P=>0.9999
Fornix	F (3, 18) = 1.356 P=0.2878	P=0.5759	P=0.7085	P=0.993	P=0.2553	P=0.4604	P=0.7644
Right fimbria	F (3, 16) = 0.5811 P=0.6359	P=0.9107	P=0.9962	P=0.8559	P=0.8474	P=0.664	P=0.9181
Left fimbria	F (3, 16) = 0.5181 P=0.6758	P=0.8334	P=0.9787	P=0.9567	P=0.6904	P=0.6465	P=0.9997
Right internal capsule	F (3, 18) = 0.8766 P=0.4716	P=0.9304	P=0.7853	P=0.6609	P=0.6732	P=0.6156	P=0.9992
Left internal capsule	F (3, 18) = 1.345 P=0.2912	P=0.5381	P=0.9122	P=0.8101	P=0.3292	P=0.2683	P=0.998
Cerebelar lobe 3	F (3, 18) = 0.6799	P=0.8082	P=0.8844	P=0.9448	P=0.5658	P=0.6217	P=0.993

	P=0.5757						
Cerebelar lobe 6	F (3, 18) = 0.3956 P=0.7577	P=0.998	P=0.7482	P=0.9948	P=0.7172	P=0.9824	P=0.834
Right hippocampus	F (3, 18) = 0.6822 P=0.5744	P=0.7798	P=0.9113	P=0.9517	P=0.5565	P=0.5957	P=0.9964
Left hippocampus	F (3, 18) = 0.7137 P=0.5565	P=0.7144	P=0.9248	P=0.9892	P=0.4996	P=0.5897	P=0.9784
Right amygdala	F (3, 18) = 0.5514 P=0.6537	P=0.8588	P=0.8919	P=0.973	P=0.6362	P=0.725	P=0.9809
Left amygdala	F (3, 15) = 0.5833 P=0.6351	P=0.7766	P=0.9988	P=0.9569	P=0.7095	P=0.5787	P=0.978

Valores de p de la comparación de ADC entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F2

Región	ANOVA	CON-NA VS. CON- A	CON- NA VS. CAF-NA	CON-NA VS. CAF- A	CON-A VS. CAF-NA	CON-A VS. CAF- A	CAF-NA VS. CAF- A
Right corpus callosum	F (3, 10) = 0.6188 P=0.6186	P=0.8452	P=0.8447	P=0.6702	P=0.9929	P=0.9999	P=0.9919

Left corpus callosum	F (3, 10) = 0.7098 P=0.5680	P=0.9125	P=0.6276	P=0.7186	P=0.9992	P=>0.9999	P=0.9991
Fornix	F (2, 10) = 0.1434 P=0.8682	NA	P=0.9373	P=0.8754	NA	NA	P=0.9911
Right fimbria	F (3, 12) = 0.3949 P=0.7590	P=0.8097	P=0.985	P=0.9984	P=0.7365	P=0.8093	P=0.9986
Left fimbria	F (3, 12) = 0.4521 P=0.7205	P=>0.9999	P=0.9827	P=0.6723	P=0.9962	P=0.8564	P=0.9155
Right internal capsule	F (2, 8) = 0.9342 P=0.4319	NA	P=0.7749	P=0.4081	NA	NA	P=0.8286
Left internal capsule	F (2, 8) = 0.3038 P=0.7461	NA	P=0.9153	P=0.7309	NA	NA	P=0.9429
Cerebelar lobe 3	F (3, 10) = 0.3258 P=0.8068	P=0.8658	P=0.9066	P=0.9315	P=0.9886	P=0.9833	P=>0.9999
Cerebelar lobe 6	F (3, 10) = 1.763 P=0.2176	P=0.892	P=0.2049	P=>0.9999	P=0.9215	P=0.8998	P=0.3048
Right hippocampus	F (3, 12) = 0.6071 P=0.6230	P=0.7728	P=0.9223	P=0.9812	P=0.5823	P=0.9433	P=0.8402
Left hippocampus	F (3, 12) = 0.1670 P=0.9166	P=0.9033	P=0.9843	P=0.9979	P=0.9874	P=0.967	P=0.9988
Right amygdala	F (3, 6) = 0.1152 P=0.9480	P=0.9782	P=0.9936	P=0.9936	P=0.9506	P=0.9506	P=>0.9999
Left amygdala	F (3, 4) = 0.1911 P=0.8974	P=0.8918	P=0.9785	P=0.9999	P=0.9939	P=0.9564	P=0.9939

Valores de p de la comparación de ADC entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F3

Región	ANOVA	CON-NA	CON-NA	CON-NA	CON-A	CON-A	CAF-NA
		VS. CON-	VS. CAF- NA	VS. CAF-	VS. CAF-NA	VS. CAF-A	VS. CAF-A
Right corpus callosum	F (3, 27) = 1.736 P=0.1832	P=0.4378	P=>0.9999	P=0.3541	P=0.4363	P=0.9971	P=0.3524
Left corpus callosum	F (3, 27) = 3.011 P=0.0475	P=0.9997	P=0.8029	P=0.0341*	P=0.9589	P=0.2126	P=0.1634
Fornix	F (3, 26) = 0.7352 P=0.5405	P=0.9945	P=0.5113	P=0.999	P=0.9515	P=0.9989	P=0.7311
Right fimbria	F (3, 26) = 0.6577 P=0.5854	P=0.648	P=0.9989	P=0.9302	P=0.5906	P=0.9305	P=0.8897
Left fimbria	F (3, 26) = 1.712 P=0.1892	P=0.3142	P=0.8564	P=0.2917	P=0.6071	P=0.9954	P=0.6435
Right internal capsule	F (3, 15) = 1.686 P=0.2127	P=0.4816	P=0.6898	P=0.2119	P=0.8732	P=0.9917	P=0.5986
Left internal capsule	F (3, 12) = 1.552 F (3, 12) = 1.552	P=0.5372	P=0.8316	P=0.2522	P=0.8239	P=0.9794	P=0.4517
Cerebelar lobe 3	F (3, 27) = 0.3319 P=0.8024	P=0.9898	P=0.7573	P=0.9913	P=0.9861	P=0.9999	P=0.9482
Cerebelar lobe 6	F (3, 27) = 0.7184 P=0.5497	P=0.892	P=0.9348	P=0.8802	P=0.6951	P=0.9993	P=0.6114

Right hippocampus	F (3, 26) = 1.951 P=0.1462	P=0.6399	P=0.4511	P=0.9504	P=0.2112	P=0.8466	P=0.2887
Left hippocampus	F (3, 26) = 2.011 P=0.1370	P=0.7817	P=0.414	P=0.879	P=0.2932	P=0.9673	P=0.1887
Right amygdala	F (3, 22) = 0.3700 P=0.7754	P=0.9204	P=0.9961	P=0.9045	P=0.8746	P=0.9982	P=0.8337
Left amygdala	F (3, 15) = 0.1591 P=0.9222	P=>0.9999	P=0.9487	P=0.9749	P=0.9531	P=0.9745	P=0.9992

Valores de p de la comparación de AD entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F1

Región	ANOVA	CON- NA VS.	CON- NA VS.	CON- NA VS.	CON-A VS.	CON-A VS.	CAF-NA VS. CAF-
		CON-A	CAF-NA	CAF-A	CAF-NA	CAF-A	A
Right corpus callosum	F (3, 18) = 1.784 P=0.1863	P=0.5221	P=0.8573	P=0.5995	P=0.2827	P=0.1884	P=0.9766

Left corpus callosum	F (3, 18) = 1.450 P=0.2614	P=0.6167	P=0.9698	P=0.6494	P=0.4597	P=0.2635	P=0.8858
Fornix	F (3, 18) = 2.261 P=0.1161	P=0.3363	P=0.5678	P=0.9964	P=0.0951	P=0.2538	P=0.5688
Right fimbria	F (3, 16) = 0.7392 P=0.5440	P=0.6503	P=0.987	P=0.9913	P=0.7412	P=0.5108	P=0.8817
Left fimbria	F (3, 16) = 0.4782 P=0.7019	P=0.6887	P=0.9768	P=0.9997	P=0.8012	P=0.6789	P=0.9785
Right internal capsule	F (3, 18) = 1.899 P=0.1660	P=0.903	P=0.3065	P=0.4095	P=0.3532	P=0.4354	P=0.9738
Left internal capsule	F (3, 18) = 2.186 P=0.1250	P=0.5138	P=0.4379	P=0.6995	P=0.1391	P=0.2124	P=0.9162
Cerebelar lobe 3	F (3, 18) = 0.9121 P=0.4547	P=0.7629	P=0.9097	P=0.8108	P=0.5362	P=0.4654	P=0.9983
Cerebelar lobe 6	F (3, 18) = 0.4867 P=0.6958	P=0.7971	P=0.9786	P=0.9853	P=0.6651	P=0.6726	P=0.9997
Right hippocampus	F (3, 18) = 0.5755 P=0.6385	P=0.8358	P=0.9381	P=.9354	P=0.6511	P=0.6464	P=>0.9999
Left hippocampus	F (3, 18) = 0.5351 P=0.6641	P=0.8014	P=0.9517	P=0.9834	P=0.6259	P=0.673	P=0.9953
Right amygdala	F (3, 18) = 1.090 P=0.3788	P=0.7827	P=0.6425	P=0.9582	P=0.3922	P=0.6075	P=0.8239
Left amygdala	F (3, 14) = 0.1957 P=0.8976	P=0.999	P=0.9708	P=0.8738	P=0.9994	P=0.9905	P=0.9859

Valores de p de la comparación de AD entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F2

Región	ANOVA	CON-	CON-	CON-	CON-A	CON-A	CAF-NA
-		NA VS.	NA VS.	NA VS.	VS.	VS. CAF-	VS. CAF-
		CON-A	CAF-NA	CAF-A	CAF-NA	A	A
Right corpus callosum	F (3, 10) = 0.6476 P=0.6021	P=0.9996	P=0.8084	P=0.6385	P=0.9203	P=0.8464	P=0.9933
Left corpus callosum	F (3, 10) = 1.614 P=0.2475	P=0.9004	P=0.5938	P=0.3805	P=0.5268	P=0.4011	P=0.9857
Fornix	F (2, 10) = 0.2304 P=0.7983	NA	P=0.9749	P=0.7808	NA	NA	P=0.9195
Right fimbria	F (3, 12) = 0.5454 P=0.6605	P=0.9562	P=0.8866	P=0.9035	P=0.7669	P=0.9999	P=0.6613
Left fimbria	F (3, 12) = 1.885 P=0.1860	P=0.5949	P=0.7448	P=0.5215	P=0.2964	P=>0.9999	P=0.2401
Right internal capsule	F (2, 8) = 1.026 P=0.4011	NA	P=0.6642	P=0.3966	NA	NA	P=0.9002
Left internal capsule	F (2, 8) = 1.007 P=0.4074	NA	P=0.3859	P=0.7452	NA	NA	P=0.8315
Cerebelar lobe 3	F (3, 10) = 0.8542 P=0.4957	P=0.9859	P=0.561	P=0.6191	P=0.9602	P=0.9726	P=0.9998
Cerebelar lobe 6	F (3, 10) = 0.8467 P=0.4993	P=0.9769	P=0.4255	P=0.9569	P=0.9362	P=0.9999	P=0.7947
Right hippocampus	F (3, 12) = 1.112 P=0.3827	P=0.9998	P=0.5164	P=0.5164	P=0.7667	P=0.7667	P=>0.9999
Left hippocampus	F (3, 12) = 2.791	P=0.701	P=0.092	P=0.2856	P=0.7575	P=0.9683	P=0.9288

	P=0.0860						
Right amygdala	F (3, 6) = 0.3676 P=0.7794	P=0.855	P=0.9979	P=0.9616	P=0.931	P=0.7369	P=0.945
Left amygdala	F (3, 3) = 0.6944 P=0.6142	P=0.8402	P=0.8402	P=0.9287	P=0.6167	P=0.9972	P=0.7045

Valores de p de la comparación de AD entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F3

Región	ANOVA	CON-NA VS. CON- A	CON-NA VS. CAF- NA	CON-NA VS. CAF- A	CON-A VS. CAF- NA	CON-A VS. CAF- A	CAF-NA VS. CAF- A
Right corpus callosum	F(3, 27) = 1.852 P=0.1616	P=0.9988	P=0.9994	P=0.1719	P=0.9958	P=0.3631	P=0.2049

Left corpus callosum	F (3, 27) = 3.120 P=0.0425	P=0.9097	P=0.9823	P=0.0601	P=0.8017	P=0.0802	P=0.1139
Fornix	F (3, 26) = 0.7505 P=0.5320	P=0.9871	P=0.5169	P=0.9999	P=0.9711	P=0.9931	P=0.6943
Right fimbria	F (3, 26) = 0.8376 P=0.4855	P=0.8873	P=0.8357	P=0.9397	P=0.5888	P=0.996	P=0.6114
Left fimbria	F (3, 26) = 1.658 P=0.2004	P=0.4406	P=>0.9999	P=0.3714	P=0.4534	P=0.999	P=0.3857
Right internal capsule	F (3, 15) = 2.550 P=0.0947	P=0.9947	P=0.9714	P=0.0796	P=>0.9999	P=0.3026	P=0.1198
Left internal capsule	F (3, 12) = 1.665 P=0.2270	P=0.6642	P=0.9915	P=0.3146	P=0.7021	P=0.9653	P=0.2785
Cerebelar lobe 3	F (3, 27) = 0.1141 P=0.9511	P=0.9634	P=0.9769	P=>0.9999	P=0.9966	P=0.9754	P=0.9898
Cerebelar lobe 6	F (3, 27) = 0.6021 P=0.6193	P=>0.9999	P=0.9976	P=0.6767	P=0.9979	P=0.8732	P=0.5809
Right hippocampus	F (3, 27) = 2.808 P=0.0585	P=0.9388	P=0.2802	P=0.6484	P=0.4063	P=0.9988	P=0.0512
Left hippocampus	F (3, 26) = 3.806 P=0.0219	P=0.9043	P=0.5508	P=0.1324	P=0.5016	P=0.8971	P=0.0138*
Right amygdala	F (3, 22) = 4.452 P=0.0137	P=0.9993	P=>0.9999	P=0.015*	P=0.9997	P=0.2227	P=0.0228*
Left amygdala	F (3, 15) = 0.4104 P=0.7479	P=0.9982	P=0.9341	P=0.9968	P=0.8952	P=>0.9999	P=0.7488

Valores de p de la comparación de RD entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F1

Región	ANOV	CON-NA	CON-NA	CON-	CON-A	CON-A	CAF-NA
0	A	VS.	VS. CAF-	NA VS.	VS. CAF-	VS.	VS.
		CON-A	NA	CAF-A	NA	CAF-A	CAF-A
Right corpus callosum	F (3, 18) = 1.039 P=0.399 2	P=0.6713	P=0.8831	P=0.8564	P=0.4221	P=0.401 4	P=>0.999 9
Left corpus callosum	F (3, 18) = 1.358 P=0.287 2	P=0.834	P=0.491	P=0.7457	P=0.3713	P=0.511 5	P=0.9245
Fornix	F (3, 18) = 0.9851 P=0.421 9	P=0.7058	P=0.7798	P=0.9914	P=0.3894	P=0.587 9	P=0.8504
Right fimbria	F (3, 16) = 0.4764 P=0.703 1	P=0.9904	P=0.9604	P=0.7724	P=0.9302	<b>P=0.822</b> 7	P=0.9585
Left fimbria	F (3, 16) = 0.6141 P=0.615 8	P=0.9681	P=0.7864	P=0.8212	P=0.7359	P=0.765 2	P=0.9986
Right internal capsule	F (3, 18) = 0.2634 P=0.850 9	P=0.9796	P=0.9953	P=0.9242	P=0.952	P=0.884 4	P=0.9804
Left internal capsule	F (3, 18) = 0.5268 P=0.669 5	P=0.8043	P=>0.9999	P=0.9597	P=0.8029	P=0.635 5	P=0.9471
Cerebelar lobe 3	F (3, 18) = 0.6058 P=0.619 8	P=0.8366	P=0.8749	P=0.9841	P=0.5931	P=0.717 8	P=0.9571
Cerebelar lobe 6	F (3, 18) = 0.3378 P=0.798 2	P=0.8602	P=0.9852	P=0.9979	P=0.7566	P=0.797 9	P=0.9963
Right hippocamp us	F (3, 18) = 0.7761	P=0.7323	P=0.8875	P=0.9675	P=0.4848	<b>P=0.563</b> 7	P=0.9834

	P=0.522 5						
Left hippocamp us	F (3, 18) = 0.8579 P=0.480 7	P=0.6486	P=0.9028	P=0.9943	P=0.4164	P=0.539 1	P=0.9497
Right amygdala	F (3, 18) = 0.3761 P=0.771 3	P=0.8919	P=0.9631	P=0.9791	P=0.7583	P=0.781	P=0.9989
Left amygdala	F (3, 15) = 0.3550 P=0.786	P=0.8724	P=0.9999	P=0.9854	P=0.8778	P=0.753 5	P=0.9646

Valores de p de la comparación de RD entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F2

Región	ANOVA	CON- NA VS. CON-4	CON-NA VS. CAF- NA	CON-NA VS. CAE-A	CON-A VS. CAF- NA	CON-A VS. CAE-A	CAF-NA VS. CAF- A
Right corpus callosum	F (3, 10) = 0.2892 P=0.832 2	P=0.791 3	P=0.9994	P=0.9961	P=0.8577	P=0.883 5	P=0.9998
Left corpus callosum	F (3, 10) = 0.8229 P=0.510 5	P=0.583 3	P=0.9998	P=0.9259	P=0.6656	P=0.436 5	P=0.9347
Fornix	F (2, 10) = 0.1227 P=0.885 8	NA	P=0.8848	P=0.9582	NA	NA	P=0.9851
Right fimbria	F (3, 12) = 0.6097 P=0.621 5	P=0.657 5	P=0.9787	P=0.9995	P=0.5793	P=0.79	P=0.9747
Left fimbria	F (3, 11) = 0.4921 P=0.694 9	P=0.959 8	P=0.7638	P=0.9939	P=0.6617	P=0.926	P=0.91
Right internal capsule	F (2, 8) = 0.1035 P=0.902 8	NA	P=0.9972	P=0.8987	NA	NA	P=0.9411

Left internal capsule	F (2, 8) = 0.8737 P=0.453 8	NA	P=0.5788	P=0.9248	NA	NA	P=0.4534
Cerebelar lobe 3	F (3, 10) = 0.3107 P=0.817 3	0.8363	P=0.9962	P=0.9962	P=0.8037	<b>P=0.803</b> 7	P=>0.999 9
Cerebelar lobe 6	F (3, 10) = 1.790 P=0.212 5	0.8797	P=0.3375	P=0.8696	P=0.9803	P=0.675 7	P=0.2035
Right hippocampus	F (3, 12) = 1.059 P=0.402 5	0.778	P=0.6278	P=0.9818	P=0.3521	P=0.696 4	P=0.8941
Left hippocampus	F (3, 12) = 0.1480 P=0.929 0	0.9764	P=0.9956	P=0.9821	P=0.9525	P=0.922 1	P=0.9994
Right amygdala	F (3, 6) = 0.5261 P=0.680 3	0.8465	P=0.9659	P=0.9131	P=0.7351	P=0.665 6	P=0.9984
Left amygdala	F (3, 4) = 0.9216 P=0.507 0	0.4647	P=0.9989	P=0.9962	P=0.5808	P=0.716 3	P=0.992

Valores de p de la comparación de RD entre los grupos clasificados como sin ansiedad y ansiedad del grupo de control o cafetería en la descendencia F3

Región	ANOVA	CON-NA	CON-NA	CON-NA	CON-A	CON-A	CAF-NA
		VS. CON-	VS. CAF-	VS. CAF-	VS. CAF-	VS. CAF-	VS.
		A	NA	A	NA	A	CAF-A

Right corpus callosum	F (3, 27) = 1.246 P=0.312 7	P=0.3662	P=0.9994	P=0.9733	P=0.3266	P=0.2812	P=0.987 7
Left corpus callosum	F (3, 27) = 0.2556 P=0.856 6	P=0.8491	P=0.9384	P=0.9909	P=0.9722	P=0.9498	P=0.997 5
Fornix	F (3, 26) = 0.6403 P=0.596 0	P=0.9984	P=0.5607	P=0.9975	P=0.9409	P=>0.999 9	P=0.795 8
Right fimbria	F (3, 26) = 0.8167 P=0.496 4	P=0.506	P=0.7065	P=0.9796	P=0.895	P=0.7685	P=0.966 6
Left fimbria	F (3, 26) = 1.482 P=0.242 5	P=0.4743	P=0.2897	P=0.54	P=0.9927	P=0.9899	P=0.999 8
Right internal capsule	F (3, 15) = 1.086 P=0.385 3	P=0.3469	P=0.703	P=0.9724	P=0.731	P=0.6316	P=0.974 7
Left internal capsule	F (3, 12) = 0.8870 P=0.475 5	P=0.6478	P=0.6403	P=0.4539	P=0.9855	P=0.9978	P=0.916 2
Cerebelar lobe 3	F (3, 27) = 0.7233 P=0.546 9	P=0.9993	P=0.4943	P=0.9598	P=0.8497	P=0.9951	P=0.894 3
Cerebelar lobe 6	F (3, 27) = 0.2658 P=0.849 4	P=0.9267	P=0.9769	P=0.9992	P=0.8151	P=0.911	P=0.996 7
Right hippocampus	F (3, 26) = 1.615 P=0.209 9	P=0.6146	P=0.4895	P=>0.999 9	P=0.21	P=0.6337	P=0.624 3
Left hippocampus	F (3, 26) = 1.537 P=0.228 6	P=0.7665	P=0.429	P=>0.999 9	P=0.2878	P=0.8112	P=0.505 7
Right amygdala	F (3, 22) = 1.002 P=0.410 5	P=0.8053	P=0.9842	P=0.6285	P=0.6967	P=0.3901	P=0.833 4
Left amygdala	F (3, 15) = 0.4161 P=0.744 0	P=>0.999 9	P=0.9702	P=0.7702	P=0.9871	P=0.8579	P=0.891 2

Right corpus callosum	F (3, 27) = 1.246 P=0.312 7	P=0.3662	P=0.9994	P=0.9733	P=0.3266	P=0.2812	P=0.987 7
Left corpus callosum	F (3, 27) = 0.2556 P=0.856 6	P=0.8491	P=0.9384	P=0.9909	P=0.9722	P=0.9498	P=0.997 5
Fornix	F (3, 26) = 0.6403 P=0.596 0	P=0.9984	P=0.5607	P=0.9975	P=0.9409	P=>0.999 9	P=0.795 8
Right fimbria	F (3, 26) = 0.8167 P=0.496 4	P=0.506	P=0.7065	P=0.9796	P=0.895	P=0.7685	P=0.966 6
Left fimbria	F (3, 26) = 1.482 P=0.242 5	P=0.4743	P=0.2897	P=0.54	P=0.9927	P=0.9899	P=0.999 8
Right internal capsule	F (3, 15) = 1.086 P=0.385 3	P=0.3469	P=0.703	P=0.9724	P=0.731	P=0.6316	P=0.974 7
Left internal capsule	F (3, 12) = 0.8870 P=0.475 5	P=0.6478	P=0.6403	P=0.4539	P=0.9855	P=0.9978	P=0.916 2
Cerebelar lobe 3	F (3, 27) = 0.7233 P=0.546 9	P=0.9993	P=0.4943	P=0.9598	P=0.8497	P=0.9951	P=0.894 3
Cerebelar lobe 6	F (3, 27) = 0.2658 P=0.849 4	P=0.9267	P=0.9769	P=0.9992	P=0.8151	P=0.911	P=0.996 7
Right hippocampus	F (3, 26) = 1.615 P=0.209 9	P=0.6146	P=0.4895	P=>0.999 9	P=0.21	P=0.6337	P=0.624 3
Left hippocampus	F (3, 26) = 1.537 P=0.228 6	P=0.7665	P=0.429	P=>0.999 9	P=0.2878	P=0.8112	P=0.505 7
Right amygdala	F (3, 22) = 1.002 P=0.410 5	P=0.8053	P=0.9842	P=0.6285	P=0.6967	P=0.3901	P=0.833 4
Left amygdala	F (3, 15) = 0.4161 P=0.744 0	P=>0.999 9	P=0.9702	P=0.7702	P=0.9871	P=0.8579	P=0.891 2