

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES INMUNES INFILTRANTES EN EL SISTEMA NERVIOSO EN UN MODELO MURINO DE PROGRAMACIÓN FETAL CON CONDUCTA SIMILAR AL AUTISMO

Por

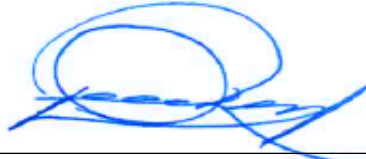
JOSÉ ALFREDO CASTILLO LUNA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2022

IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES INMUNES INFILTRANTES EN EL SISTEMA NERVIOSO EN UN MODELO MURINO DE PROGRAMACIÓN FETAL CON CONDUCTA SIMILAR AL AUTISMO

**Comité de Tesis**




---

Dra. Diana Reséndez Pérez  
**Presidente**



---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
**Secretario**



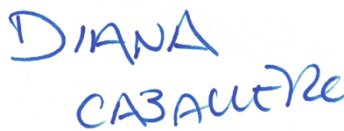
---

Dr. Fermín Mar Aguilar  
**Vocal**



---

Dra. Claudia Dalila Altamirano Torres  
**Vocal**



---

Dra. Diana Elia Caballero Hernández  
**Vocal**



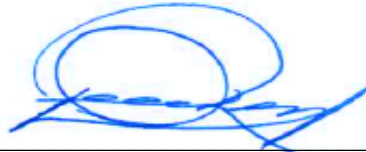
SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

---

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
**Subdirector de Posgrado**

IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES INMUNES INFILTRANTES EN EL  
SISTEMA NERVIOSO EN UN MODELO MURINO DE PROGRAMACIÓN  
FETAL CON CONDUCTA SIMILAR AL AUTISMO

**Dirección de Tesis**



---

Dra. Diana Reséndez Pérez  
**Director Interno**



---

Dr. Alberto Camacho Morales  
**Director Externo**

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres la Sra. Martha y el Sr. Alfredo, ellos siempre me han apoyado con todos mis estudios y metas, me han enseñado a trabajar y a superar la adversidad, me han motivado y apoyado a ser una mejor persona día a día, y junto con mis hermanos Christian y Nallely son mi razón para seguirme superando. También a Jazmín quien me ha ayudado tanto personal como emocionalmente a superar momentos difíciles, y quien siempre me ha impulsado y ayudado a ser una mejor persona.

A mis directores el Dr. Alberto Camacho Morales y a la Dra. Diana Reséndez Pérez por aceptarme en sus laboratorios, la introducción al mundo de las neurociencias durante mi servicio social con el Dr. Alberto fue un paso muy importante para decidir qué es lo que quiero realizar con mi vida y en quien me quiero convertir. Gracias a ambos por todas sus revisiones, consejos y la oportunidad de trabajar en sus laboratorios.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y a todo su equipo de Profesores-Investigadores y personal administrativo, siempre me trataron de la forma más adecuada junto a muchos de los estudiantes de posgrado, los cuales con mucho respeto siempre me ayudaron en el manejo de equipos, reactivos y situaciones desconocidas en su momento.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, amigos, maestros, y a todos aquellos que olvidé mencionar, los cuales sembraron en mí una semilla de motivación, profesionalismo y buenas prácticas para seguirme superando y avanzando.

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud, al Departamento de Bioquímica y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por brindarme las instalaciones para desarrollar este proyecto. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización del proyecto.

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios**

Tú, quien me has guiado en mis decisiones día con día.

### **A mi familia**

Todo lo que han hecho por mí, nadie pudiese haberlo hecho, ¡solo ustedes!

### **A mis amigos y personas importantes en mi vida**

por todo el apoyo que me han brindado tanto académica como personalmente, gracias a  
ustedes me encuentro donde siempre quise estar

# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>2</b>
2.1. El Trastorno del Espectro Autista.....	2
2.2. Factores implicados en el desarrollo del TEA.....	2
2.3. Comunicación entre el sistema inmune periférico y el sistema nervioso central, y su contribución al desarrollo de TEA.....	5
2.4. La Activación Inmune Materna favorece el desarrollo de TEA en la descendencia.....	7
2.5. La MIA promueve la infiltración de células inmunes periféricas y un perfil proinflamatorio sistémico y cerebral en la descendencia.....	10
2.6. La neuroinflamación y la microglía modulan la susceptibilidad a TEA .....	15
2.7. La programación nutricional materna favorece el desarrollo de inflamación sistémica .....	17
<b>3. Justificación .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>23</b>
<b>5. Objetivos .....</b>	<b>24</b>
5.1. General.....	24
5.2. Particulares .....	24
<b>6. Material y Métodos .....</b>	<b>25</b>
6.1. Material biológico .....	25
6.2. Estrategia experimental.....	25
6.2.1. Programación fetal de modelos murinos por dieta .....	25
6.2.1.1. Programación con dieta control.....	25
6.2.1.2. Programación con dieta cafetería.....	25
6.2.2. Pruebas conductuales para la identificación de conductas semejantes al TEA..	26
6.2.2.1. Sociabilidad en tres cámaras .....	26
6.2.2.2. Entierro de canicas .....	27
6.2.2.3. Campo abierto .....	28
6.2.3. Disección y recolección de tejido cerebral .....	29
6.2.4. Aislamiento de poblaciones inmunes infiltrantes y células mononucleares.....	30
6.2.5. Determinación de poblaciones inmunes infiltrantes y fenotipo microglial.....	31
6.2.6. Análisis estadístico.....	32

<b>7. Resultados .....</b>	<b>33</b>
7.1. La descendencia de ratones expuestos a dieta cafetería presentan conducta similar al TEA .....	33
7.2. La programación nutricional por dieta cafetería no promueve infiltración de células inmunitarias al cerebro de la descendencia .....	37
7.3. La programación nutricional por dieta cafetería no favorece cambios en la densidad ni en los fenotipos M1/M2 de la microglía.....	42
<b>8. Discusión .....</b>	<b>45</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>50</b>
<b>10. Perspectivas .....</b>	<b>51</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>52</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la dieta cafetería .....	26
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Factores implicados en el desarrollo de Trastorno del Espectro Autista.....	3
<b>Figura 2.</b> La Activación Inmune Materna.....	8
<b>Figura 3.</b> Distribución del plexo coroideo en el cerebro humano.....	11
<b>Figura 4.</b> Infiltración de células inmunes al cerebro a través de las meninges y el plexo coroideo.....	12
<b>Figura 5.</b> Infiltración de células inmunes en individuos con TEA y modelos murinos de MIA.....	15
<b>Figura 6.</b> La activación de receptores tipo Toll desencadenan vías proinflamatorias sobre la microglía.....	21
<b>Figura 7.</b> Administración de dietas.....	26
<b>Figura 8.</b> Prueba de sociabilidad en tres cámaras.....	27
<b>Figura 9.</b> Prueba de entierro de canicas.....	28
<b>Figura 10.</b> Prueba de campo abierto.....	28
<b>Figura 11.</b> Metodología para disección cerebral.....	29
<b>Figura 12.</b> Gradiente de densidad de Percoll.....	30
<b>Figura 13.</b> Porcentajes de muerte celular.....	32
<b>Figura 14.</b> Desempeño de la descendencia en campo abierto y entierro de canicas.....	34
<b>Figura 15.</b> Desempeño de la descendencia en sociabilidad en tres cámaras.....	36
<b>Figura 16.</b> Células inmunes infiltrantes en plexo coroideo.....	37
<b>Figura 17.</b> Células inmunes infiltrantes en regiones cerebrales.....	39
<b>Figura 18.</b> Linfocitos y macrófagos infiltrantes por región anatómica.....	41
<b>Figura 19.</b> Microglía en regiones cerebrales.....	42
<b>Figura 20.</b> Fenotipo microglial en regiones cerebrales.....	44

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados	<b>mg</b>	miligramos
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro	<b>MIA</b>	Activación Inmune Materna
<b>CAF</b>	Dieta cafetería	<b>mL</b>	Mililitros
<b>CCL</b>	Ligando de quimiocina con motivo C-C	<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>CTRL</b>	Dieta CTRL	<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>CXCL</b>	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C	<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados al daño	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>DC</b>	Células dendríticas	<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>g</b>	Gravedades	<b>t-exp</b>	Tiempo de exploración
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	<b>t-int</b>	Tiempo de interacción
<b>h</b>	Horas	<b>TEA</b>	Trastorno del espectro autista
<b>HFD</b>	Dieta alta en grasas	<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>IFN</b>	Interferón	<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>IL</b>	Interleucina	<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido	<b>Δ Tiempo</b>	Grado de interacción
<b>M1</b>	Fenotipo proinflamatorio	<b>µm</b>	Micrómetros
<b>M2</b>	Fenotipo antiinflamatorio		

## RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo que presenta diversas causas etiológicas en las que destacan una gran variedad de estímulos ambientales, genéticos e inmunológicos, sin embargo, los mecanismos celulares que lo promueven no están del todo claros. La activación del sistema inmune durante la etapa del desarrollo embrionario, conocida como programación fetal, favorece mayor infiltración de células inmunes periféricas hacia el cerebro a través de zonas de comunicación periferia-cerebro que incluyen al plexo coroideo y zonas circunventriculares, alterando la densidad y activación microglial hacia un fenotipo proinflamatorio. Se propone que la exposición a dieta con alto valor energético tiene el potencial de programar a la descendencia durante su desarrollo fetal y favorecer la infiltración de células inmunes periféricas hacia el cerebro. En esta tesis empleamos un modelo murino de ratones C57BL/6 que fueron expuestos a dieta con alto valor energético (cafetería) durante el desarrollo embrionario y lactancia. La estrategia experimental consistió en evaluar el efecto nocivo de la dieta en la conducta social, locomotora, repetitiva-estereotipada y similar a la ansiedad. Además, se determinó el número de células inmunes infiltrantes (NK (NK1.1<sup>+</sup>), dendríticas (CD11c<sup>+</sup>), linfocitos (CD11b<sup>-</sup> – CD45<sup>+</sup>), macrófagos (CD11b<sup>+</sup> – CD45<sup>high</sup>)), la densidad microglial (CD11b<sup>+</sup> – CD45<sup>low</sup>) y sus fenotipos M1 (CD86<sup>+</sup>) y M2 (CD206<sup>+</sup>) en el plexo coroideo y regiones cerebrales de importancia para el TEA (corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado) mediante citometría de flujo. Nuestros resultados demostraron que la exposición a una dieta de cafetería durante el desarrollo fetal induce déficit en la interacción social y comportamientos repetitivos-estereotipados en la descendencia macho, acompañados de un aumento en los niveles de infiltración de linfocitos en la corteza cerebral y el hipocampo en comparación con el plexo coroideo. No se observaron cambios significativos en los niveles de infiltración celular (NK, dendríticas, linfocitos, macrófagos) en el plexo coroideo ni en las regiones de corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado. El efecto de la exposición a la dieta cafetería tampoco afecta la densidad microglial, ni altera sus fenotipos M1/M2. Nuestros resultados indican que la infiltración de células inmunes periféricas y/o la activación de la microglía no parecen contribuir al defecto conductual. La utilización de modelos “*double-hit*” podrían consolidar de mejor manera el fenotipo de TEA en la descendencia.

## ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder with a variety of etiological causes, including a wide range of environmental, genetic, and immunological stimuli; however, the cellular mechanisms that promote it are not entirely clear. The activation of the immune system during embryonic development, known as fetal programming, favors greater infiltration of peripheral immune cells into the brain through peripheral-brain communication zones that include the choroid plexus and circumventricular zones, altering microglial density and activation towards a pro-inflammatory phenotype. It is proposed that exposure to high-energy diet has the potential to program the offspring during fetal development and favor the infiltration of peripheral immune cells into the brain. In this thesis, we used a murine model of C57BL/6 mice that were exposed to a high-energy diet (cafeteria) during embryonic development and lactation. The experimental strategy consisted of evaluating the deleterious effect of the diet on social, locomotor, repetitive-stereotyped and anxiety-like behavior. In addition, the number of infiltrating immune cells (NK (NK1.1<sup>+</sup>), dendritic (CD11c<sup>+</sup>), lymphocytes (CD11b<sup>-</sup> - CD45<sup>+</sup>), macrophages (CD11b<sup>+</sup> - CD45<sup>high</sup>)), microglial density (CD11b<sup>+</sup> - CD45<sup>low</sup>) and their M1 (CD86<sup>+</sup>) and M2 (CD206<sup>+</sup>) phenotypes in the choroid plexus and brain regions of relevance to ASD (cerebral cortex, hippocampus, striatum) by flow cytometry. Our results demonstrated that exposure to a cafeteria diet during fetal development induces deficits in social interaction and repetitive-stereotyped behaviors in male offspring, accompanied by increased levels of lymphocyte infiltration in the cerebral cortex and hippocampus compared to the choroid plexus. No significant changes were observed in the levels of cell infiltration (NK, dendritic, lymphocytes, macrophages) in the choroid plexus or in the cerebral cortex, hippocampus, striatum regions. The effect of cafeteria diet exposure also does not affect microglial density, nor does it alter their M1/M2 phenotypes. Our results indicate that peripheral immune cell infiltration and/or microglial activation do not seem to contribute to the behavioral defect. The use of "double-hit" models could better consolidate the ASD phenotype in the offspring.

# 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, el humano ha estado expuesto a su interacción con el medio ambiente y se ha adaptado de manera eficiente a los cambios que le exige. Las pandemias de la viruela en el siglo XVIII o de la Peste Negra en el siglo XIV provocaron grandes pérdidas económicas y de vidas humanas. Sin embargo, más allá de las repercusiones a corto plazo, las pandemias y epidemias por agentes bacterianos o virales generan consecuencias negativas en la salud a largo plazo. Por ejemplo, se documentó que la epidemia de la rubéola en los años de 1960-1970, en la población de Estados Unidos, tuvo efectos negativos en madres embarazadas, que además fueron transmitidos a sus hijos durante el periodo embrionario (Chess 1977). Se documentó un incremento del 2 % al 13 % en el número de casos de autismo de aquellas madres que fueron diagnosticadas con rubéola. Este acontecimiento dio comienzo a la contribución de la activación del sistema inmunológico de la madre, y más tarde a la propuesta de programación fetal, como un estado crítico del desarrollo embrionario que podría contribuir a la manifestación de alteraciones del neurodesarrollo en el feto e incrementar la susceptibilidad a presentar el trastorno del espectro autista (TEA) posterior al nacimiento.

Estos antecedentes sentaron las bases de los conceptos de la activación inmune materna como un factor contribuyente a la manifestación de trastornos sobre la descendencia a través de la desregulación del delicado ambiente materno-fetal durante la gestación. Con ello, esta propuesta enfatiza la importancia de la exposición de la madre embarazada a factores externos nocivos que promueven la activación del sistema inmune durante periodos críticos del desarrollo del feto. En los últimos años, este concepto se le ha denominado programación fetal y se ha considerado un evento clave en la generación de efectos permanentes en la salud de la descendencia.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. El Trastorno del Espectro Autista**

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) se define como un trastorno del neurodesarrollo que suele manifestarse antes de los tres años de nacido. Las características conductuales asociadas a este tipo de trastorno se caracterizan por presentar déficit en el establecimiento de interacciones sociales y de la comunicación con otros individuos, adquisición y mantenimiento de patrones repetitivos y estereotipados de comportamiento, y vulnerabilidad al desarrollo de ansiedad (Spain et al. 2020; Waye y Cheng 2018). De interés, los individuos con TEA presentan un amplio grado de alteraciones conductuales que muchas veces integran diversas manifestaciones en el comportamiento que no son totalmente esclarecidas, es por ello por lo que se ha acuñado la terminología de espectro, confirmando los diversos grados de la enfermedad.

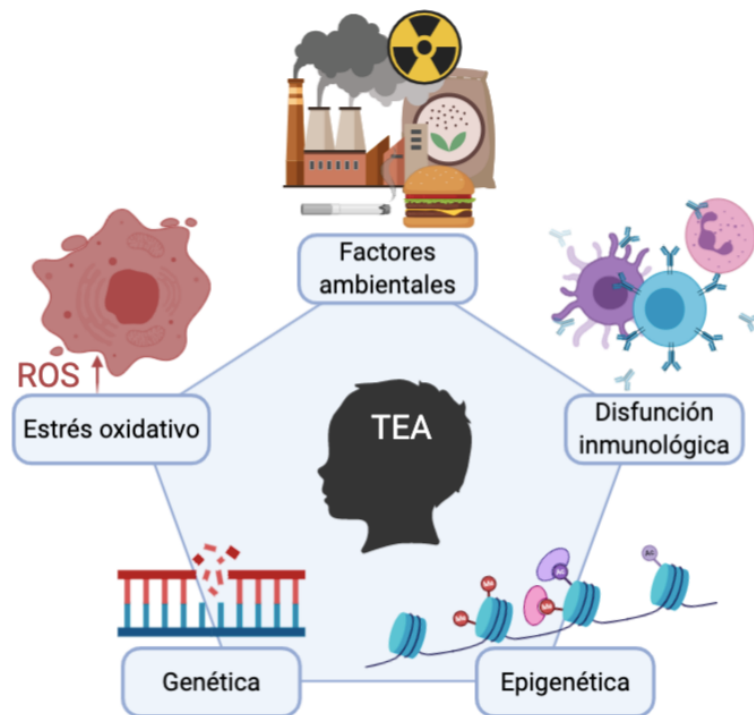
De acuerdo con la Red de Monitoreo de Autismo y Discapacidades del Desarrollo del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, se estima que la prevalencia del TEA incluyó en promedio 1 de cada 54 niños de 8 años en el 2016, representando el 1.9 % de la población. Además, se sabe que este trastorno es 4.3 veces más común en niños (3 %) en comparación con las niñas (0.7 %) (CDC 2020; Maenner et al. 2020; NIMH 2020).

En México no se tienen registros completos de la epidemiología del TEA. Uno de los reportes más claros del TEA en México se realizó en León, Guanajuato, en donde se incluyó una muestra de 12,200 niños de 8 años en el periodo 2011-2012 y se determinó que 8.7 de cada 1000 niños fue diagnosticado con autismo. Además, se identificó que la relación de individuos con este trastorno era 4.1 veces mayor en niños (80.6 %) que en niñas (19.4 %), siendo los datos en México consistentes con muchos otros reportes en diversas regiones del mundo (Fombonne et al. 2016).

### **2.2. Factores implicados en el desarrollo del TEA**

Investigaciones a lo largo de los años han confirmado que el desarrollo del TEA se favorece por diversos estímulos y/o afecciones de causas diversas, las cuales convergen

en vías moleculares comunes que reproducen las características únicas de la enfermedad (Wong y Hoeffler 2018). Se cuenta con contundente evidencia científica que demuestra que los cambios genéticos y epigenéticos incrementan la susceptibilidad a presentar este trastorno en los individuos; sin embargo, la etiología del TEA es mucho más compleja y se ha propuesto que las interacciones ambientales pueden regular procesos moleculares a nivel interacción gen-ambiente y favorecer la aparición de conductas aberrantes similares al autismo (Figura 1) (Bölte et al. 2019; Goines y Ashwood 2013).



**Figura 1. Factores implicados en el desarrollo de Trastorno del Espectro Autista.** La etiología del TEA es multifactorial e involucra cambios génicos, alteraciones en la regulación epigenética, estrés oxidativo, daño al DNA y factores ambientales como la alimentación, la exposición a toxinas y contaminantes, e incluso la disfunción del sistema inmunológico a nivel prenatal o posnatal. Realizado en BioRender.com.

La contribución genética asociada al TEA ha llevado a muchos investigadores a trabajar en la identificación de genes de riesgo desencadenantes de este trastorno (Nisar et al. 2019). La identificación de marcadores selectivos y reproducibles acerca de la arquitectura alélica del TEA es heterogénea y no ha sido certera, concluyendo que no existen variantes genómicas de riesgo en más del 1% de los individuos con este trastorno (Sanders et al. 2011). Entre los principales factores de riesgo a nivel genético se reportan



variaciones en el número de copias y variaciones en secuencias de un solo nucleótido en genes como VPS13B, WWOX, CNTNAP2, RBFOX1, MACROD2, APBA2, PARK2, GPHN y RNF113A (Bacchelli et al. 2020), las mutaciones en el gen MECP2 se presentan hasta en el 4% de los individuos con TEA (Lu et al. 2020; Wang et al. 2016), y algunas otras como variaciones genéticas del gen de oxitocina y su respectivo receptor (Cataldo et al. 2018; Rylaarsdam y Guemez-Gamboa 2019).

Las alteraciones epigenéticas también han sido implicadas en la susceptibilidad del TEA. De manera simple, la epigenética es el estudio de los cambios en la función génica que son heredables a la descendencia sin la implicación de cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA. Se estima que existe un 19,5% de reguladores epigenéticos en 215 genes candidatos relacionados con el TEA (Duffney et al. 2018). Los loci de susceptibilidad epigenética incluyen a menudo genes implicados en la metilación (KMT2C, KMT5B, KDM6B); proteínas remodeladoras de cromatina (MeCP2, CHD8, POGZ); proteínas de unión/corte y empalme de RNA (FMRP y genes de la familia RBFOX); proteínas de modificación postraduccional (UBE3A, MIB1) o factores de transcripción (ADNP); entre muchos otros genes (Rylaarsdam y Guemez-Gamboa 2019). De hecho, la metilación del DNA, acetilación de histonas e incluso la remodelación de la cromatina podrían incrementar la susceptibilidad al TEA (Goodwin y Picketts 2018; Sun et al. 2016; Tremblay y Jiang 2019). De interés, el donador de metilo para el DNA es el 5-metil-tetrahidrofolato, estimándose que cambios genéticos o ambientales en los niveles de folato o en el metabolismo del folato podría dar lugar a alteraciones en la metilación del ADN y contribuir a presentar autismo (Waye y Cheng 2018).

Evidencia epidemiológica y experimental confirman que la exposición a factores ambientales también puede promover el desarrollo de trastornos psiquiátricos que incluyen al TEA. Por ejemplo, el consumo de alcohol y tabaco, exposición a agentes tóxicos (contaminación del aire, metales pesados, pesticidas, contaminantes orgánicos), la nutrición y el entorno fetal (infecciones congénitas, activación inmune materna, obesidad, diabetes e hipertensión), (Bölte et al. 2019), o los perfiles de hipoxia tisular en los tejidos (Bölte et al. 2019; Modabbernia et al. 2017; Raggi et al. 2020), son factores que

contribuyen a incrementar el riesgo de TEA. En este sentido, la exposición a agentes tóxicos tales como el ácido valproico, plastificantes, etanol, metales pesados, o bien, un estado de inflamación crónica de bajo grado presente en la obesidad materna, pueden activar una respuesta inflamatoria materna y alterar el desarrollo temprano y óptimo del cerebro de los descendientes, contribuyendo al desarrollo de trastornos como TEA (Han et al. 2021; Nuttall 2017). En este contexto, diversos reportes han confirmado la presencia de autoanticuerpos específicos de cerebro, respuestas de linfocitos T alteradas hacia el antígeno y la producción aberrante de citocinas en individuos con TEA (Bilbo et al. 2018).

En resumen, las evidencias epidemiológicas y experimentales confirman que la inflamación y la desregulación de la activación inmune son factores contribuyentes en la etiología del TEA (Goines y Ashwood 2013; Meltzer y Van de Water 2017; Ormstad et al. 2018). La contribución de la respuesta inmune en el TEA es el tema principal de esta tesis y se abordará a profundidad en el desarrollo de las siguientes secciones.

### **2.3. Comunicación entre el sistema inmune periférico y el sistema nervioso central, y su contribución al desarrollo de TEA**

El sistema inmune integra el principal mecanismo de defensa contra los organismos patógenos invasores y se divide generalmente en dos grandes mecanismos: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato reacciona de manera inmediata, uniforme y no selectiva a la primera y posterior exposición a un patógeno, esto mediante células derivadas en su mayoría de progenitores mieloides como los macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas y proteínas del sistema de complemento. Por su parte, el sistema inmunológico adaptativo se “adapta” selectivamente, de modo que una exposición secundaria a un patógeno da como resultado una respuesta más rápida y aumentada (respuesta secundaria) en comparación con la primera exposición (respuesta primaria). La inmunidad adaptativa a su vez se subdivide en dos ramas, la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular, la primera está mediada por proteínas conocidas como anticuerpos que son secretados por células plasmáticas (linfocitos B), mientras que la segunda está mediada por diversas subpoblaciones de linfocitos T, tales como cooperadores (CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (CD8<sup>+</sup>).

Idealmente, la activación de estos sistemas favorece la eliminación de cualquier microorganismo invasor antes de que se desarrollen patologías o síntomas, o bien, previene la infección inicial (Chaplin 2010; Kellie y Al-Mansour 2017).

A pesar de que el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC) se encuentran aparentemente “aislados” uno del otro, diversas investigaciones han descrito que ambos sistemas interactúan íntimamente a lo largo de la vida (Bilbo y Schwarz 2012; Prinz y Priller 2017). Desde hace mucho tiempo se conoce que el SNC posee células residentes como las neuronas, los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos, aunque también se ha documentado la acumulación de macrófagos perivasculares. De manera notable, estas células residentes son capaces de producir citocinas, quimiocinas y expresar receptores durante el desarrollo fisiológico del cerebro. Además, el sistema inmune periférico se comunica con el cerebro a través de citocinas, quimiocinas o incluso mediante interacción directa con células residentes de cerebro y proveer así una interacción constante (Prinz y Priller 2017).

La contribución del sistema inmunológico en el desarrollo del TEA comenzó a identificarse desde hace más de 50 años (1960-1970), confirmándose la asociación del autismo en niños con infección congénita de rubéola, posiblemente asociado con el incremento de citocinas e interferón en células infectadas que podrían contribuir a defectos congénitos. Se conoce que las concentraciones de citocinas sistémicas, como las IL-1, IL-6, IL-8, TNF, IFN y en incremento de la señal del receptor Toll tipo 4 (TLR-4, es un receptor de reconocimiento de patrones, uno de los más estudiados e involucrado durante la inmunidad innata) son mediadores del desarrollo anormal y de la restricción del crecimiento fetal, además de favorecer parto prematuro (Shukla y Maraqa 2020; Yockey e Iwasaki 2018). Estudios adicionales documentaron vínculos entre otras infecciones virales sistémicas y el desarrollo de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple y los trastornos del espectro autista (Chess 1977; Mawson y Croft 2019). Si bien estos datos confirman la activación del sistema inmune periférico posterior a la infección, existen reportes que han identificado inflamación y activación inmune celular en el

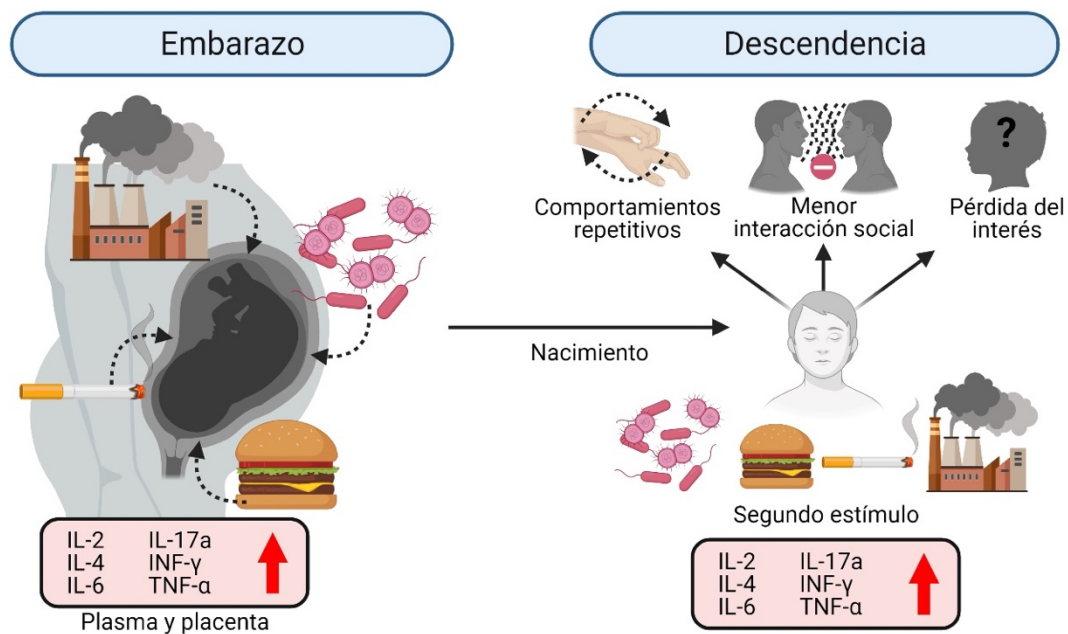
cerebro de individuos con TEA a través de la determinación de marcadores como quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL10) y citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), que en su mayoría responden a las células de microglía y de manera secundaria a los astrocitos y otros tipos celulares (Cheeran et al. 2009). En este contexto, a nivel del SNC, la microglía y los astrocitos pueden reaccionar y ser reactivos a los estímulos inflamatorios y responder a ellos mediante la liberación de citocinas proinflamatorias, además de inducir la disfunción sináptica (Matta et al. 2019). Estas evidencias confirman que la activación inmune está presente en sujetos con TEA.

#### **2.4. La Activación Inmune Materna favorece el desarrollo de TEA en la descendencia**

La Activación Inmune Materna (MIA, por sus siglas en inglés) es un evento fisiológico en donde los sistemas inmunes innato y adaptativo maternos son activados por diversos inductores externos, tales como las infecciones, estrés, autoinmunidad, asma, alergias o inflamación, lo cual desencadena una cascada de citocinas y alteraciones inmunológicas que afectan negativamente el desarrollo embrionario del feto y favorecen la aparición de fenotipos adversos en la descendencia. Se conoce que la MIA es capaz de inducir alteraciones en el sistema nervioso central y favorecer en la descendencia el desarrollo de trastornos y manifestaciones psiquiátricas que incluyen al TEA y la esquizofrenia (Figura 2) (Kreitz et al. 2020; Minakova y Warner 2018).

Investigaciones en los últimos años han demostrado que la inducción de la MIA también ocurre mediante la ingesta de dietas con alto contenido calórico o inclusive en estados de obesidad materna. De interés, la exposición de nutrientes hipercalóricos pueden influir directa o indirectamente sobre el sistema inmunológico, por lo que pueden perturbar el embarazo y el desarrollo fetal cuando se ingieren en cantidad o equilibrio inadecuados (Bordeleau et al. 2021; Dhaliwal et al. 2019; Reynolds et al. 2014). Por ejemplo, el exceso nutricional relacionado con la promoción de inflamación se basa en altos niveles de carbohidratos refinados y grasas saturadas, y bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA n-3) y fibra (Kiecolt-Glaser 2010; Oz 2017), constituyentes que son característicos de una dieta occidental (*western*). El consumo excesivo de estos nutrientes durante el embarazo, en especial de grasas (ácido palmítico y esteárico), tienen

la capacidad de inducir citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) asociados a la activación de vías de señalización de TLR-4 – NF- $\kappa$ B en trofoblastos (Yang et al. 2015). Este efecto también ha sido confirmado en modelos de MIA (Ozaki et al. 2020), por lo que se propone que la presencia de un perfil proinflamatorio e incluso el deterioro de la barrera hematoencefálica inducido por inflamación metabólica y sistémica favorece la acumulación de citocinas cerebrales y el desarrollo de neuroinflamación (Więckowska-Gacek et al. 2021). Contrariamente, la administración de PUFA n-3 importantes para el tejido neural (ácido docosahexaenoico) ha demostrado aliviar los comportamientos similares al autismo en un modelo murino de MIA (Weiser et al. 2016). Por su parte, la presencia de obesidad en forma de incremento de tejido adiposo promueve acumulación de TNF- $\alpha$  y citocinas proinflamatorias (IL-6, ICAM-1, Proteína C Reactiva, leptina), además de favorecer la infiltración de macrófagos locales y eventos de disfunción endotelial (Parisi et al. 2021). De interés, se ha observado que un estado de obesidad materna también puede promover al transporte placentario ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos e incluso células inmunes maternas, infiltrándose en el tejido fetal y persistiendo hasta la edad adulta (Parisi et al., 2021).



**Figura 2. La Activación Inmune Materna.** La exposición a factores que activan el sistema inmunológico de la madre induce la generación de moléculas inflamatorias durante el periodo gestacional, esto causa defectos en el desarrollo del sistema nervioso central de la descendencia, aumentando los niveles de moléculas inmunes inflamatorias y desencadenando las características presentes en el TEA. Realizado en BioRender.com.

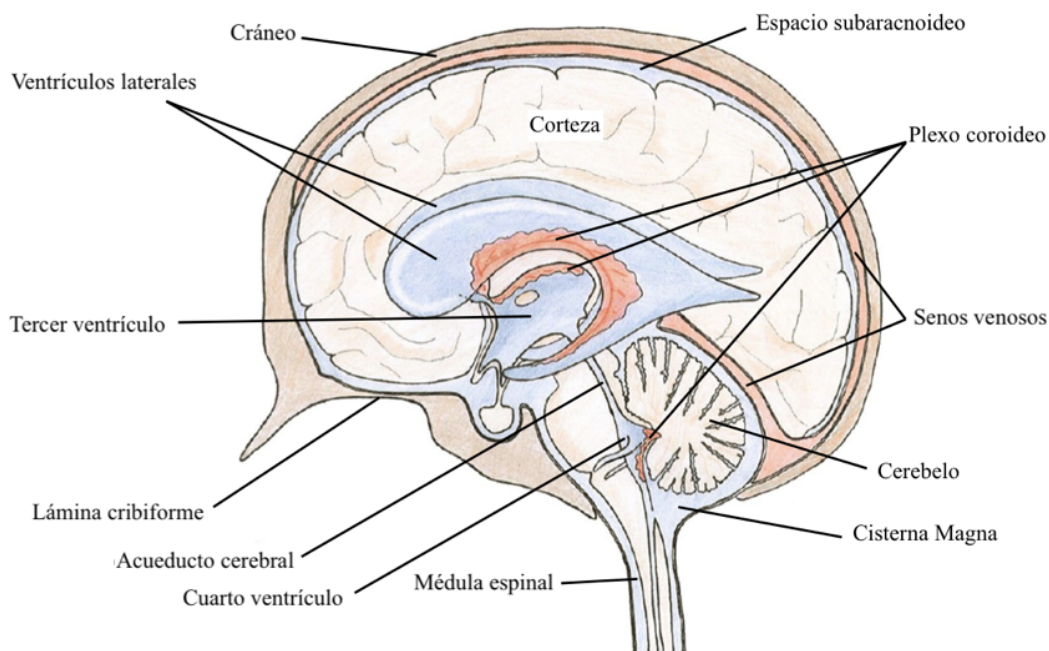
Se sabe que MIA es capaz de inducir defectos en el desarrollo del SNC de la descendencia, tentativamente mediante el aumento de moléculas inmunes inflamatorias como las citocinas. Esta hipótesis es respaldada por la investigación en modelos animales, demostrando que la inducción de MIA es suficiente para causar neuropatologías en la descendencia (Estes y McAllister 2016; Jiang et al. 2018). De hecho, dichas moléculas inflamatorias han sido reportadas como mediadores de trastornos conductuales en la descendencia, tal y como ocurre con la MIA posterior a la infección materna (Ozaki et al. 2020). Se piensa que los desencadenantes de la MIA en periodos críticos de la gestación no son causantes directos de neuropatologías ni trastornos sobre la descendencia, más bien se cree que la MIA predispone a la descendencia a presentar estos trastornos durante su desarrollo tardío. Además, la MIA podría afectar el desarrollo del SNC fetal a través del aumento de citocinas proinflamatorias a nivel periférico en las madres y su posterior infiltración en el cerebro fetal durante el desarrollo (Masi et al. 2017). Esto implica que el sistema inmune periférico se comunica con el sistema nervioso central a través de la infiltración de citocinas, contribuyendo a la regulación negativa de la función cerebral.

Estudios preclínicos empleando modelos animales expuestos sistémicamente al ácido poliinosínico:policitidílico (Poly (I:C)), el cual simula un RNA de doble cadena (dsRNA), desarrollan la activación de MIA. Molecularmente, el Poly I:C se une a los receptores Toll tipo 3 (TLR-3) y activa la señalización de factores de transcripción corriente abajo de los efectores IRF-3, AP-1 y NF- $\kappa$ B que concluyen en la producción de IFN tipo I (Figura 6) (Li et al. 2012). En este sentido, el Poly I:C imita las infecciones virales durante el embarazo, favoreciendo una respuesta inflamatoria durante el periodo gestacional (Kreitz et al. 2020; Minakova y Warner 2018). Los resultados demuestran que la administración sistémica de Poly (I:C) promueve la susceptibilidad de anomalías neuroconductuales en que simulan varios trastornos neuropsiquiátricos como el autismo, la esquizofrenia y la depresión (Chang et al. 2020; Meyer 2014; Reisinger et al. 2015). En particular, la descendencia de madres expuestas a Poly (I:C) presentaron anomalías en el comportamiento, la interacción social y la exploración que correlaciona con incremento en la inflamación libre de infección (Meltzer y Van de Water 2017; Shi et al. 2003).

A la fecha, se han postulado dos posibles hipótesis que vinculan a la MIA durante los periodos críticos del desarrollo gestacional y su impacto en la función cerebral: 1) MIA altera o interrumpe de manera permanente el desarrollo de circuitos neuronales relacionados con la conducta, el aprendizaje o la memoria; y 2) MIA reprograma la función inmune del individuo modificando su respuesta a un desafío inmune posterior a través de respuestas exageradas de citocinas proinflamatorias o la atenuación de la regulación antiinflamatoria, en donde ambos eventos aberrantes afectarían los procesos de conducta y cognición del individuo (Bilbo y Schwarz 2012). En esta investigación estamos interesados en abordar la segunda propuesta, que fundamenta la contribución de la inmunidad materna en el desarrollo del TEA a través de la infiltración de células del sistema inmune periférico al cerebro.

### **2.5. La MIA promueve la infiltración de células inmunes periféricas y un perfil proinflamatorio sistémico y cerebral en la descendencia**

El cerebro es uno de los órganos más importantes del cuerpo humano y tiende a ser más vulnerable en periodos críticos del desarrollo embrionario. En este contexto, agresiones o estímulos externos en el periodo de gestación e incluso durante la infancia y niñez temprana han demostrado tener un riesgo potencial de causar daños o incluso patologías a largo plazo. El cerebro contiene tres relevantes barreras naturales que lo protegen de agentes nocivos externos: la barrera hematoencefálica, la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y la barrera aracnoidea. A pesar de contener dichas barreras, el cerebro se encuentra en constante comunicación con el sistema periférico. La barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, también conocida como plexo coroideo, es un epitelio fenestrado que se encuentra dentro de los ventrículos cerebrales (Figura 3), el cual representa un sitio de comunicación entre la periferia y el cerebro, además, de ser el principal generador del líquido cefalorraquídeo. Esta íntima comunicación entre sistema central y periférico es fundamental para promover el correcto desarrollo cerebral (Hladky y Barrand 2018; Praetorius y Damkier 2017).



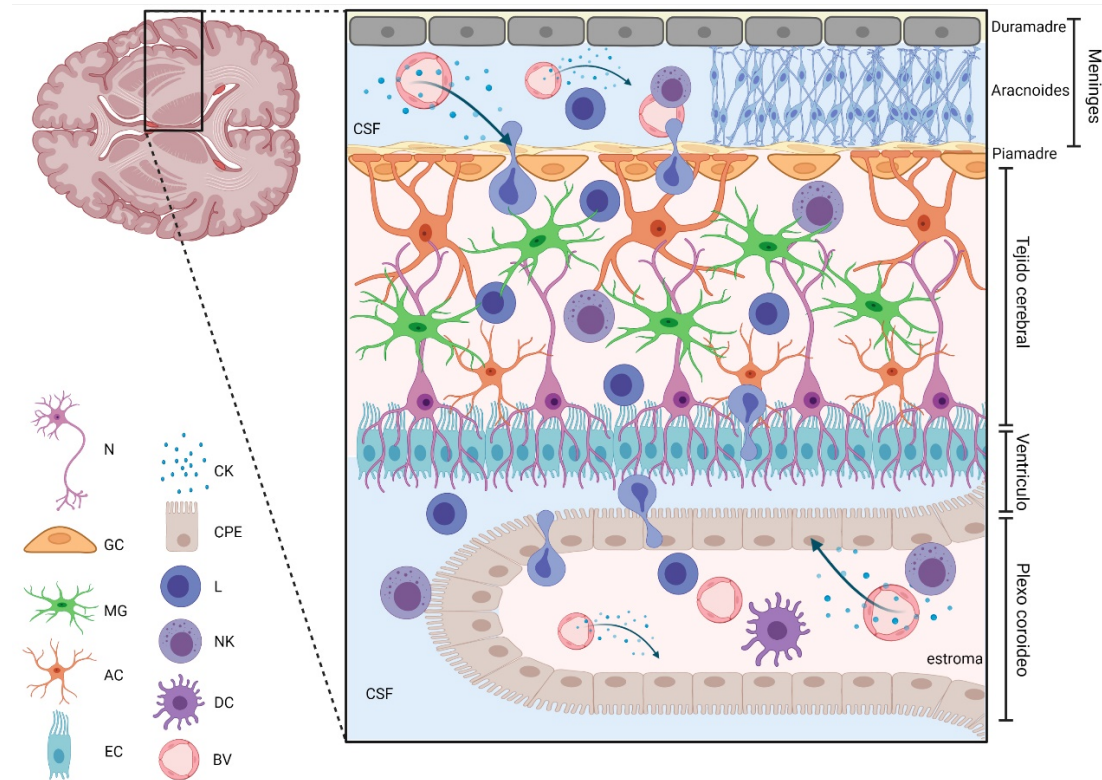
**Figura 3. Distribución del plexo coroideo en el cerebro humano.** El plexo coroideo es un epitelio que se encuentra dentro de ambos ventrículos cerebrales, el tercer y cuarto ventrículo. Tomado y modificado de Hladky y Barrand 2018.

Si bien existen zonas como el plexo coroideo que por sus características permite una libre comunicación del estroma con la sangre periférica, en un estado de inflamación cerebral (neuroinflamación), dichas barreras pueden perder su función y presentar transporte no selectivo de células y moléculas, permitiendo de esta manera la infiltración de citocinas, quimiocinas y hasta una mayor cantidad de células inmunes al cerebro (Figura 4) (Demeestere et al. 2015; Rua y McGavern 2018; Takata et al. 2021).

Existe cada vez más evidencia que la MIA y la neuroinflamación inducen trastornos del neurodesarrollo como el TEA, el deterioro cognitivo y la depresión (Jiang et al. 2018). Las bases fisiológicas que permiten la infiltración y acumulación de citocinas periféricas en el cerebro no son del todo conocidas, sin embargo, se han propuesto varios mecanismos. En principio se piensa que las citocinas podrían atravesar la barrera hematoencefálica mediante un sistema de transporte de flujo de entrada saturable o a través de transporte axonal retrógrado, o bien, a través de su ingreso por difusión simple en órganos circunventriculares (Yarlagadda et al. 2009). Estudios recientes documentan vías humorales, neutrales y celulares como posibles rutas de comunicación periférica con el cerebro, que incluye: 1) la activación de segundos mensajeros en el parénquima cerebral



por parte de células endoteliales, 2) la transmisión de señales de citocinas por vías del SNC periféricas como el nervio vago, y 3) la entrada de monocitos periféricos activados que liberan citocinas en el parénquima cerebral (Capuron y Miller 2011).



**Figura 4. Infiltración de células inmunes al cerebro a través de las meninges y el plexo coroideo.** La inflamación meníngea puede alterar el estado de permeabilidad de las meninges y los vasos sanguíneos, permitiendo que se infiltren células inmunes periféricas hacia el líquido cefalorraquídeo y posteriormente hacia el cerebro (Takata et al., 2021). En el plexo coroideo, las células inmunes periféricas también pueden infiltrarse a través del endotelio fenestrado y posteriormente migrar a través de las células epiteliales del plexo coroideo para infiltrarse e interactuar con las células residentes del cerebro (Demeestere et al., 2015). N, neuronas; GC, células gliales; MG, microglía; AC, astrocitos; EC, células endoteliales; BV, vaso sanguíneo; DC, células dendríticas; NK, células asesinas naturales; L, linfocitos; CPE, células epiteliales del plexo coroideo; CK, citocinas; CSF, líquido cefalorraquídeo. Modificado de Demeestere et al. 2015 y realizado en BioRender.com.

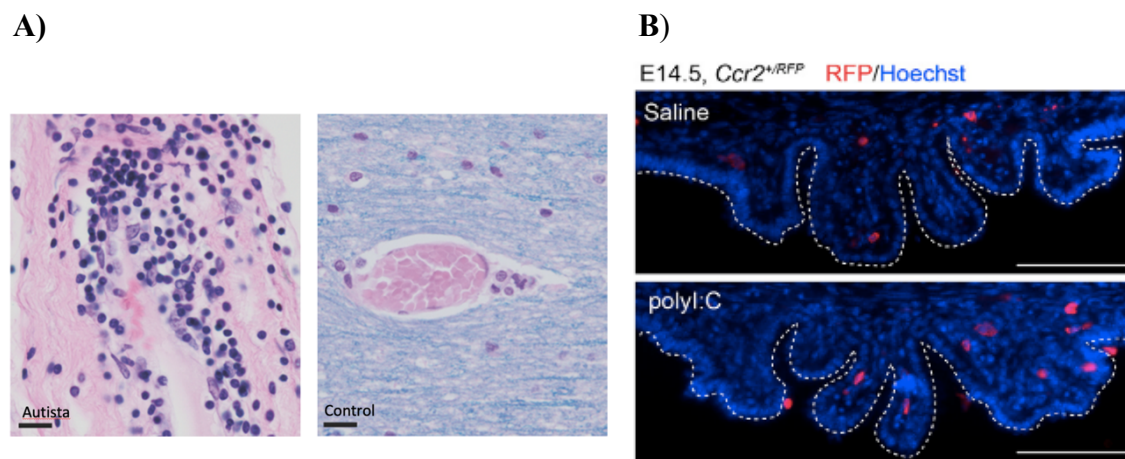
La sobreexpresión de citocinas proinflamatorias tanto a nivel sistémico como a nivel cerebral está relacionada con inducir un fenotipo de TEA sobre los descendientes o empeorar sus características conductuales. Estudios de perfil sérico han reportado que madres de infantes diagnosticados con TEA y con un fenotipo de discapacidad intelectual presentaron mayores niveles de citocinas y quimiocinas como GM-CSF,  $INF-\gamma$ ,  $IL-1\alpha$  e  $IL-6$  (Jones et al. 2017). Se tienen reportes de infantes diagnosticados con TEA que presentan perfiles altos de citocinas como BDNF,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-5$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-12$ ,

IL-13, IL-17 e IL-23 (Ricci et al. 2013; Suzuki et al. 2011) y en un metaanálisis se reportaron menores concentraciones de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y IL-1Ra (Saghazadeh et al. 2019). Estas evidencias sugieren que el perfil inflamatorio mostrado en TEA se reproduce en modelos animales expuestos a MIA. Se tiene evidencia de que citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 pueden atravesar la barrera hematoencefálica e inducir cambios en regiones cerebrales como el hipotálamo (Masi et al. 2017). Estudios en roedores indican que la administración de la citoquina proinflamatoria IL-6 altera el desarrollo del cerebro fetal, además de favorecer los déficits del neurodesarrollo de sus descendientes (Smith et al. 2007). Se piensa que la activación de IL-6 en la placenta es necesaria para transmitir señales inflamatorias al cerebro del feto y causar enfermedades del neurodesarrollo, de hecho, la administración de anticuerpos neutralizantes de IL-6 previenen el fenotipo alterado por MIA (Smith et al. 2007; Wu et al. 2017). De manera inversa, la sobreexpresión transgénica de IL-6 decrece la neurogénesis en el hipocampo (Li y Zhang 2016; Vallières et al. 2002).

Adicional al incremento de citocinas proinflamatorias en la sangre y cerebro de modelos animales expuestos a MIA o de sujetos con TEA, se han observado acumulaciones cerebrales de diferentes tipos celulares del sistema inmune periférico. Las células T CD4<sup>+</sup> son capaces de infiltrarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR) desde los ganglios linfáticos cervicales a través del plexo coroideo y las venas meníngeas (Louveau et al. 2017). Análisis post mortem reportan un aumento en la cantidad de células T-CD8<sup>+</sup> perivasculares en vasos sanguíneos del parénquima cerebral de cerebros autistas (Figura 5A) (DiStasio et al. 2019). Por su parte, un estudio adicional determinó menores niveles periféricos de linfocitos B en individuos con TEA (Bressler et al. 2012), mientras que otro estudio reporta aumentos séricos de hasta un 20% de linfocitos B en niños con autismo (Ashwood et al. 2011). Fisiológicamente, se han determinado poblaciones de células B en zonas como el plexo coroideo, meninges, cerebelo y medula espinal y se piensa que podrían infiltrarse a estas zonas desde la sangre y contribuir a la oligodendrogénesis durante la etapa neonatal (Tanabe y Yamashita 2019). Además, un incremento del 40% en células NK ha sido reportado a nivel periférico en individuos con TEA (Ashwood et al. 2011; Bressler et al. 2012); también se ha reportado aumento de los complejos

activadores de células NK (aKIR/HLA), o bien decremento (KIR/HLA) en los niños con TEA, en donde la actividad de las células NK está modulada por la interacción entre las proteínas del receptor tipo inmunoglobulina (KIR) y sus ligandos HLA afines en las células placentarias y el trofoblasto, esta interacción de las moléculas de KIR y HLA inducen la activación inmunitaria que influyen en el desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso central y fetal (Guerini et al. 2014). De interés, las células NK contribuyen a la neuroinflamación durante la sepsis, específicamente un subconjunto de células NK (CD11b<sup>+</sup> – CD27<sup>+</sup>) se ha reportado que migra al cerebro posterior a la infiltración de neutrófilos (He et al. 2016). Las células dendríticas desempeñan un papel clave en la modulación de las respuestas inmunitarias y las diferencias en las frecuencias o funciones de estas células pueden provocar una disfunción inmunológica en niños con TEA (Breece et al. 2013). Se ha determinado que individuos con TEA a nivel periférico tienden a presentar porcentajes significativamente más altos de células dendríticas plasmocitoides y mieloides a comparación de individuos sanos (Saad et al. 2017). El estudio del papel de las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> en el SNC tiene algunas limitantes, ya que la microglía puede regular al alza la expresión de células positivas a CD11c durante la inflamación, lo que hace difícil distinguir las células dendríticas derivadas de la médula ósea comparadas con la microglía residente del cerebro (Hoye et al. 2018). Si bien se ha determinado que existen poblaciones de células dendríticas residentes en cerebro, también se ha observado que en padecimientos como la isquemia cerebral las células dendríticas de la periferia tienen la capacidad de migrar al SNC, sin embargo, su papel en diversos padecimientos no está del todo dilucidado (Felger et al. 2010). En el plexo coroideo de la descendencia de ratones administrados con Poly I:C se ha observado que se promueve la infiltración de monocitos provenientes específicamente de la periferia (Figura 5B) (Cui et al. 2020).

En su conjunto, estas evidencias confirman la presencia de tipos inmunes celulares del sistema periférico que migran al SNC, en donde probablemente contribuyan a la regulación de la neuroinflamación y el desarrollo de TEA.



**Figura 5. Infiltración de células inmunes en individuos con TEA y modelos murinos de MIA.** A) Se observa una mayor infiltración de células inmunes (linfocitos perivasculares) en vasos sanguíneos del parénquima cerebral de individuos con un diagnóstico de autismo (barra de escala = 40  $\mu\text{m}$ ); tomado y modificado de DiStasio et al. 2019. B) Mayor infiltración de monocitos ( $Ccr2^{+/RFP}$ ) en el cuarto ventrículo del plexo coroideo en la descendencia de ratones administrados con Poly I:C, molécula utilizada para inducir activación inmune materna (barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ ); tomado de Cui et al. 2020.

## 2.6. La neuroinflamación y la microglía modulan la susceptibilidad a TEA

La neuroinflamación es la respuesta inflamatoria que se produce especialmente en el SNC y el cerebro, y está definida por cuatro características principales: 1) activación de macrófagos (microglía), 2) aumento de citocinas y quimiocinas, 3) reclutamiento de células inmune periféricas y locales, 4) daño tisular (Woodburn et al. 2021). Esta respuesta puede ser favorecida por células residentes del cerebro que incluyen a los astrocitos, células inmunes que logran infiltrarse al cerebro (células T, monocitos, macrófagos, células dendríticas y NK) y por la microglía. En estas condiciones, se liberan grandes cantidades de mediadores que promueven la inflamación, tales como las citocinas, quimiocinas, y especies reactivas de oxígeno que pueden dañar tejido, causar edema y, potencialmente, ocasionar la muerte neuronal. En este contexto, la neuroinflamación se ha observado y asociado a una gran diversidad de lesiones cerebrales, enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer, y trastornos como la depresión mayor y el TEA (Greene et al. 2019; Lurie 2018).

Entre las células más importantemente implicadas en el desarrollo de neuroinflamación se encuentra la microglía. La microglía se origina de progenitores eritromieloides en el saco vitelino durante el desarrollo embrionario, es considerada una

célula inmune residente de cerebro con características transcripcionales únicas de macrófago (Gogoleva et al. 2019; Woodburn et al. 2021). Se han asociado diversidad de funciones relacionadas con la salud (homeostasis, reparación del sistema nervioso, eliminación de sinapsis (*pruning*), modulación del comportamiento social) y a la enfermedad (aumento de citocinas y quimiocinas, reclutamiento de células inmunitarias periféricas y locales, daño tisular, impulsar la neuroinflamación) (Gogoleva et al. 2019; Woodburn et al. 2021).

Existe evidencia acerca de la existencia de estados de polarización de la microglía, siendo un estado M1 (proinflamatorio) impulsado por la exposición de la microglía a moléculas como el LPS e IFN, reconocidos por TLR-4 y TLR1-2, activando factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y STAT-1 y finalmente incrementando la expresión de marcadores de superficie como CD86 y MHC-II; al igual que un estado M2 (antiinflamatorio) impulsado por la exposición de la microglía a moléculas como IL-4 e IL-13, reconocidos por sus respectivos receptores (IL-4R), activando factores de transcripción como STAT6 y finalmente incrementando la expresión de marcadores de superficie como CD206 y el receptor de manosa (Orihuela et al. 2016). Sin embargo, estudios más recientes mencionan que si bien, anteriormente se pensaba que la microglía, al igual que los macrófagos, puede ser tanto proinflamatoria (M1) como antiinflamatoria (M2), la microglía puede pasar de un estado homeostático a uno patológico con la consiguiente adquisición del fenotipo asociado (Gogoleva et al. 2019; Ransohoff 2016).

De manera específica, la microglía posee un sensoma complejo con la capacidad de adaptarse a su entorno, respondiendo a alarminas tipo I (PAMPs) o tipo II (DAMPs) e incluso otros factores como las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Hickman y El Khoury 2019). Su identidad de macrófagos, su condición de células residentes y la flexibilidad a estímulos convierten a la microglía en un objetivo novedoso para un mejor entendimiento de las interacciones entre el eje intestino-cerebro, el microbioma y MIA en diversas patologías relacionadas con trastornos del neurodesarrollo, tales como el TEA (Cowan y Petri 2018).

Una de las hipótesis más fuertes que relacionan a la función de la microglía con el desarrollo del TEA es su efecto exacerbado de la poda sináptica aberrante y la alteración

de la densidad neuronal, favoreciendo trastornos neuroanatómicos (Prata et al. 2019). La microglía está estrechamente controlada por el microambiente local y se sabe que la MIA es capaz de inducir un “*priming*” o cebado que exagera su función, el cual representa un factor clave en un amplio espectro de síndromes y enfermedades del desarrollo neurológico y fenotipos conductuales (Knuesel et al. 2014). A la fecha no se conocen con certeza los mecanismos moleculares vinculados a la activación del cebado en la microglía. Se ha descrito que diversas citocinas pueden ingresar al cerebro a través de zonas como los órganos circunventriculares en donde la barrera hematoencefálica está ausente, logrando desencadenar respuestas inflamatorias en el cerebro dependientes de la microglía (Cowan y Petri 2018; Johnston y Webster 2009). En este sentido, la citocina más importantemente involucrada en el desarrollo de TEA durante la activación del sistema inmune periférico es la IL-17. Se ha determinado que pacientes con TEA tienden a presentar niveles elevados en sangre de IL-17A, que correlaciona con la gravedad de los síntomas conductuales. Además, la activación de la MIA posterior a la administración de Poly (I:C) en ratones aumenta los niveles de IL-17 en la sangre de las madres y en los cerebros de los descendientes, que correlaciona con un aumento en el nivel de mRNA de IL-17 en la placenta (Wong y Hoeffler 2018). De hecho, la administración intraventricular de IL-17a a ratones C57BL/6 es capaz de activar la microglía cortical y promover el incremento de marcadores relacionados con la fagocitosis (Sasaki et al. 2020), sugiriendo un decremento de terminales sinápticas.

Con base a estas evidencias, se ha propuesto que la microglía podría mediar la activación la vía de IL-17 y contribuir a la patología semejante al TEA observada durante la inducción de MIA a nivel del SNC (Choi et al. 2016; Cowan y Petri 2018).

## **2.7. La programación nutricional materna favorece el desarrollo de inflamación sistémica**

La programación fetal se puede definir como la modulación de la salud o enfermedad de un individuo posterior al nacimiento, por la exposición de estímulos durante periodos críticos del desarrollo. En específico, la exposición a factores ambientales hostiles, como la desnutrición y la sobrenutrición, el estrés, etc., favorecen la

programación fetal. En dichos estados, la programación fetal induce una respuesta en el feto en desarrollo a adaptarse a las nuevas condiciones en el útero, favoreciendo cambios irreversibles en la descendencia, predisponiéndola a futuros problemas de salud (Marciniak et al. 2017; Moreno-Fernandez et al. 2020).

Los modelos animales de programación calórica y dietas altas en grasas muestran aumentos de leptina, insulina, glucosa, triglicéridos y citocinas inflamatorias de la madre, contribuyendo a alteraciones del comportamiento de la descendencia, que incluyen la afección de las interacciones sociales, aumento de ansiedad, comportamientos depresivos, deterioro cognitivo e hiperactividad (Sullivan et al. 2015). Datos de nuestro grupo de investigación confirman que la programación materna por exposición a dieta alto contenido energético (llamada dieta de cafetería) induce alteraciones metabólicas que incluyen la alteración en la sensibilidad de la insulina, hipertensión, disfunción endotelial, el aumento de la adiposidad y la regulación del apetito (Cardenas-Perez et al. 2018; Maldonado-Ruiz et al., 2019a).

La exposición de dieta con alto contenido energético durante la programación materna también promueve el desarrollo de inflamación sistémica y contribuye al desarrollo de TEA en la descendencia. Datos epidemiológicos y preclínicos demuestran que la presencia de un balance positivo de energía corporal, como en la obesidad o durante la ingesta de una dieta con alto contenido energético, es capaz de inducir inflamación sistémica de bajo grado, conocido como inflamación metabólica. La inflamación metabólica incluye a un proceso que promueve el desarrollo de un perfil inflamatorio en aquellos sujetos que son expuestos a ingesta excesiva de alimento y que también se observa durante la obesidad materna. Se ha descrito que este proceso está relacionado con la acumulación de ácidos grasos libres en plasma, la cual promueve respuesta proinflamatoria a nivel central y periférico a través de la activación de TLR-4 (Marrone y Coccorello 2019; Rogero y Calder 2018). Algunos autores sugieren que los ácidos grasos no son directamente ligandos de TLR-4, sin embargo, lo que sí está claro es que durante la exposición de fórmulas ricas en lípidos saturados se favorece la activación de TLR-4 y la inflamación (Figura 6) (Lancaster et al. 2018). De manera notable, la exposición a dieta

alto contenido energético también induce en la descendencia un perfil inflamatorio aberrante y la activación de la microglía a nivel cerebral (Maldonado-Ruiz et al. 2019a). Las alteraciones cerebrales debidas a la exposición de dietas altas en grasas durante el embarazo también inducen anomalías micro y macroestructurales cerebrales en la descendencia que involucran cambios en el volumen cerebral que perduran hasta la edad adulta y modifican la conducta del individuo (Trujillo-Villarreal et al. 2021). Desconocemos si dichas alteraciones cerebrales asociadas a la exposición de dietas con alto contenido energético se encuentran presentes en sujetos que presentan conducta similar al TEA. Además, se ha sugerido que la programación materna mediante dietas hipercalóricas durante el desarrollo puede establecer una intercomunicación inmunitaria central y periférica que potencialmente podría modular los defectos macro y microestructurales del cerebro que conducen a la susceptibilidad al autismo (Maldonado-Ruiz et al. 2019b).

Molecularmente, se ha observado que modelos animales expuestos a dieta materna alta en grasas (HFD) presentan cambios de diversos mediadores inflamatorios como CD11b, IL-6, NF- $\kappa$ B, TLR-4 en el cerebro, además de un aumento de citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-4, IL-6, en su conjunto, confiriendo un mayor riesgo al feto más allá de la etapa de desarrollo intrauterino y durante todo el proceso de desarrollo de la progeñie (Bordeleau et al. 2021; Dhaliwal et al. 2019; Reynolds et al. 2014). La evidencia de modelos de roedores y primates no humanos indican que el consumo materno de HFD causa niveles elevados de marcadores inflamatorios en el cerebro, que tiene un largo impacto a largo plazo en conductas como la ansiedad y el aprendizaje (Bilbo y Tsang 2010; Grayson et al. 2010; Sullivan et al. 2010). En roedores, el consumo de un HFD durante el embarazo aumenta los marcadores de activación microglial y citocinas proinflamatorias en el hipocampo de la descendencia (Bilbo y Tsang 2010).

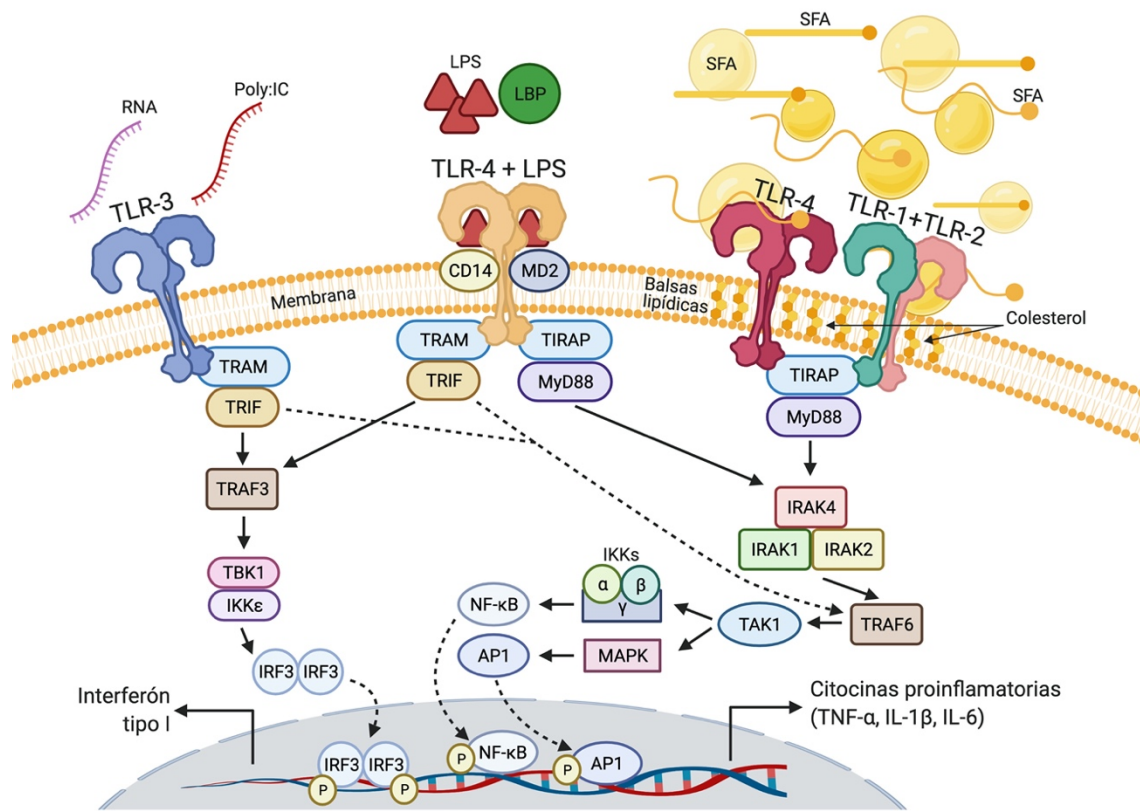
Es muy bien conocido que el incremento en la ingesta de ácidos grasos saturados y decremento de ácidos grasos poliinsaturados impacta en el neurodesarrollo con consecuencias negativas en el comportamiento (De Crescenzo et al. 2020). Sin embargo, los mecanismos moleculares que se asocian a este efecto no están del todo claros. Algunos trabajos han identificado que la deficiencia de omega-3 en la dieta materna empeora la



disfunción intestinal temprana inducida por MIA, en parte debido a la modificación del microbioma intestinal y una mayor reactividad inflamatoria local (Leyrolle et al. 2021). Por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta como el butirato, los cuales representan productos metabólicos de la microbiota intestinal, se cree que modulan el sistema inmunológico periférico con un impacto en la proliferación de células T reguladoras (Furusawa et al. 2013). Por otra parte, la exposición a dieta hipercalórica en un modelo murino establece una reprogramación transcriptómica y epigenómica de las células progenitoras mieloides que muestran una mayor proliferación y respuesta inmune innata en etapas posteriores (Christ et al. 2018). El efecto de la exposición materna a la dieta hipercalórica durante el embarazo y su papel en la modulación epigenética de la inmunidad que conduce al TEA no ha sido totalmente dilucidado; sin embargo, de ser así, estos efectos parecen permanecer hasta la edad adulta acompañados de cambios conductuales (Keleher et al. 2018).

En su conjunto, la exposición de dietas con alto contenido energético durante el embarazo recapitula vías moleculares semejantes a lo exhibido por los modelos de MIA por LPS y Poly I:C (Figura 6). Si bien la evidencia implica a la vía dependiente de los TLR-4 – NF- $\kappa$ B como los principales mediadores proinflamatorios, se conoce que una dieta alta en grasas saturadas puede aumentar la cantidad de ácidos grasos libres en circulación, ingresar al cerebro y estimular a las células residentes de cerebro favoreciendo la inflamación (Butler et al. 2020; Howe et al. 2022). Específicamente, el ácido palmítico ha sido denominado el principal ácido graso saturado que se encuentra en una dieta alta en grasas, y se conoce que puede inducir una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-4, aumentando la liberación de citocinas proinflamatorias sobre microglía (Butler et al. 2020). Otros investigadores proponen que si bien los ácidos grasos saturados como el ácido láurico y el ácido palmítico pueden activar vías proinflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B sobre la microglía, al no ser ligandos específicos para TLR-1/2 y TLR-4 respectivamente, otros mecanismos como la asociación de balsas lipídicas puede promover la heterodimerización u homodimerización de TLR-4 respectivamente (Cruz-Carrillo y Camacho-Morales 2020; Lancaster et al. 2018; Maldonado-Ruiz et al. 2017). Todas estas vías de activación tienen en común una desregulación inmune hacia un perfil

proinflamatorio que puede ser desencadenada de diversas formas: infecciones virales mediante el reconocimiento de RNA viral por receptores como los TLR-3 los cuales activan la vía del Interferón tipo I, moléculas homólogas a un RNA bicatenario como lo es Poly (I:C) el cual se tiene bien caracterizado que induce MIA en modelos murinos mediante TLR-3 e infecciones bacterianas mediante el reconocimiento de LPS por receptores como los TLR-4 que desencadenan vías de señalización para la producción de citocinas proinflamatorias.



**Figura 6. La activación de receptores tipo Toll desencadenan vías proinflamatorias sobre la microglía.** Los receptores TLR-3 y TLR-4 convergen en las mismas vías de señalización proinflamatoria rio abajo en la cascada de señalización a pesar de que estos receptores se activan por vías distintas. La homodimerización de TLR-4 y la heterodimerización de TLR-1/2 por si solas puede activar las mismas vías de señalización proinflamatoria, se cree que un exceso de SFA en la dieta altera la actividad de balsas lipídicas, promoviendo la dimerización y heterodimerización de TLRs (Lancaster et al. 2018). Tomado y modificado de Fimal et al. 2020 y Maldonado-Ruiz et al. 2017. Realizado en BioRender.com.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El autismo es una enfermedad que afecta la capacidad de integración de los individuos en la sociedad, aunque su prevalencia se incrementa cada año, no se conocen con certeza las alteraciones moleculares y/o fisiológicas que dan lugar a su desarrollo. La presencia de un estado de inflamación crónica de bajo grado durante el embarazo podría programar a la descendencia a alterar la función y/o estructura cerebral, representando uno de los principales agentes etiológicos del desarrollo del TEA en nuestra población.

Con base en esta información, la identificación del efecto de la exposición fetal a dieta con alto contenido energético (dieta cafetería) durante el embarazo, en la infiltración de células del sistema inmune periférico al cerebro y su contribución en el desarrollo de fenotipo proinflamatorio de la microglía en la descendencia, nos permitirá identificar vías y mecanismos celulares potencialmente involucrados en la activación del cebado de la microglía cuyo proceso parece estar altamente relacionado con el desarrollo del fenotipo de TEA en la descendencia.

#### **4. HIPÓTESIS**

El consumo de dieta cafetería durante el embarazo promueve la infiltración de células del sistema inmune periférico al cerebro a través del plexo coroideo y la activación de la microglia, favoreciendo la conducta semejante al TEA en la descendencia.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. General**

Caracterizar las poblaciones celulares del sistema inmune periférico que se infiltran por el plexo coroideo hacia el cerebro y el fenotipo microglial (M1/M2) en la descendencia con conducta semejante al TEA de madres expuestas a dieta cafetería.

### **5.2. Particulares**

- Identificar la conducta semejante al TEA en la descendencia de ratones expuestos a dieta cafetería durante su desarrollo embrionario
- Determinar la presencia de células inmunitarias infiltrantes en el plexo coroideo y en regiones cerebrales relacionadas con el TEA de la descendencia con conducta semejante al TEA.
- Caracterizar el fenotipo microglial (M1/M2) en regiones cerebrales relacionadas con el TEA de la descendencia con conducta semejante al TEA.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico

Todos los procedimientos de este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEIBA) de la UANL bajo la clave de registro CEIBA-2021-005 y cumplieron con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB-UANL, en ciclos de luz/oscuridad de 12 h con acceso a comida y agua *ad libitum*.

### 6.2. Estrategia experimental

#### 6.2.1. Programación fetal de modelos murinos por dieta

##### 6.2.1.1. Programación con dieta control

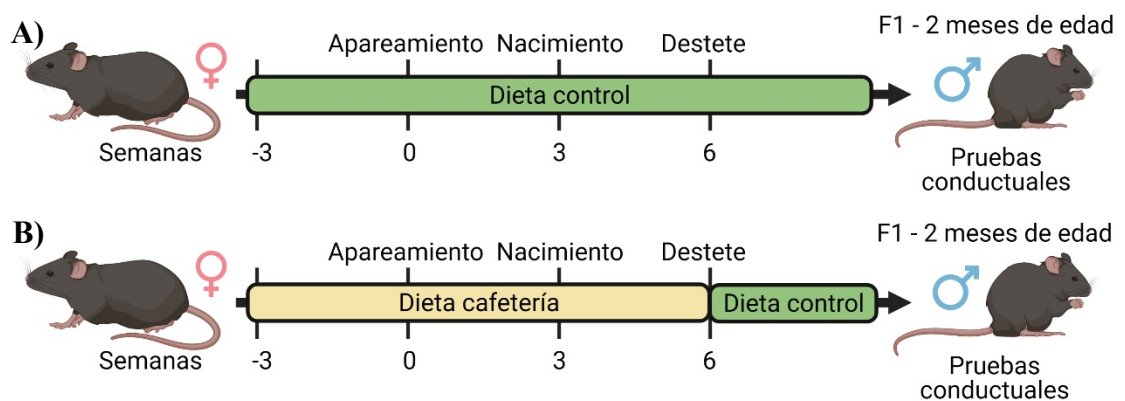
Hembras de la cepa C57BL/6 de nueve semanas de edad fueron alimentadas con dieta control (CTRL) (*Laboratory Rodent Diet* 5001: 58% carbohidratos, 13% lípidos y 29% proteínas; densidad calórica = 3.36 kcal/g) y agua *ad libitum* hasta cumplir los tres meses de edad. Al cumplir tres meses de edad se realizó la cruce con machos de la misma cepa y de la misma edad. Las crías se destetaron a las cuatro semanas de edad y se separó a la descendencia macho, colocando un ratón por jaula y manteniéndolos con dieta estándar y agua *ad libitum* hasta cumplir dos meses de edad, tiempo al que se llevaron a cabo las pruebas conductuales (Figura 7) (Cruz-Carrillo et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2021).

##### 6.2.1.2. Programación con dieta cafetería

Hembras de la cepa C57BL/6 de nueve semanas de edad fueron alimentadas con dieta cafetería (CAF) (39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas; densidad calórica = 3.72 kcal/g) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) *ad libitum* hasta cumplir los tres meses de edad. Al cumplir tres meses de edad se realizó la cruce con machos de la misma cepa y de la misma edad. Las hembras se mantuvieron alimentadas con dieta CAF durante la gestación (tres semanas) y la lactancia (tres semanas). Las crías se destetaron a las cuatro semanas de edad y se separó a la descendencia macho, colocando un ratón por jaula y manteniéndolos con dieta estándar y agua *ad libitum* hasta cumplir

dos meses de edad, tiempo al que se llevaron a cabo las pruebas conductuales (Figura 7) (Cruz-Carrillo et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2021).

Tabla 1. Composición de la dieta cafetería	
Galletas Marías®	200 g
Papitas Sabritas Original®	200 g
Chocolate líquido Hershey's®	200 g
Tocino Fud®	200 g
Pate de cerdo Swam®	400 g
Polvo de pellets de comida estándar	200 g



**Figura 7. Administración de dietas.** Representación esquemática de la administración de las dietas **A) CTRL** y **B) CAF**. Las dietas fueron administradas tres semanas antes del apareamiento, durante la gestación y durante la lactancia.

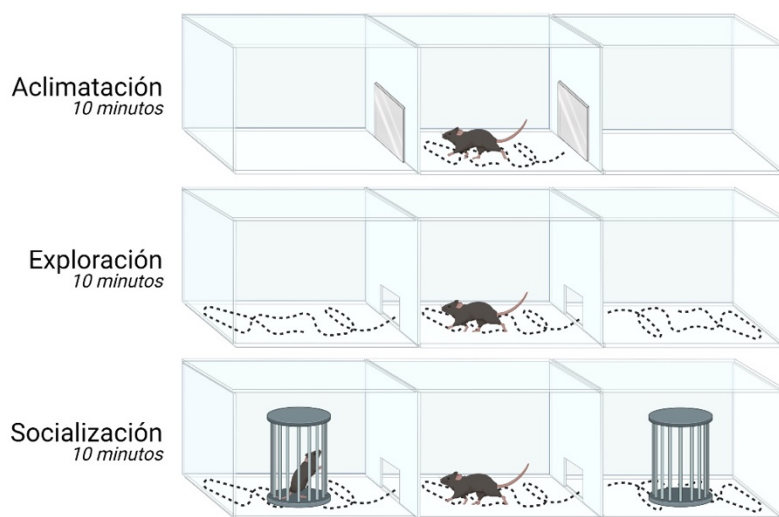
## 6.2.2. Pruebas conductuales para la identificación de conductas semejantes al TEA

Las pruebas conductuales se realizaron en la descendencia machos y fueron evaluados en la Unidad de Neurometabolismo del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, FACMED-UANL. Los roedores fueron transportados al sitio de la prueba 30 minutos antes de iniciar los experimentos, con la finalidad de que se aclimaten al sitio. Cada una de las pruebas se llevó a cabo con un día de separación.

### 6.2.2.1. Sociabilidad en tres cámaras

Para esta prueba se utilizó una arena de tres cámaras e incluye tres fases: 1) habituación, 2) exploración y 3) socialización (Figura 8). Los ratones “desconocidos” fueron habituados a la arena de tres cámaras, encerrado a cada uno de ellos en jaulas cilíndricas colocadas dentro de una de las cámaras laterales de la arena por 10 minutos, este procedimiento se realizó durante cuatro días antes de comenzar la prueba. En la fase

de habituación, los ratones se colocaron en la cámara central de la arena con las puertas laterales cerradas durante 10 minutos. En la fase de exploración, se retiraron las puertas que bloqueaban las cámaras laterales y se le permitió al ratón recorrer la arena libremente por 10 minutos; además, se cuantificó el tiempo que el roedor pasa en cada una de las cámaras laterales, a ese valor se le denominó: “tiempo de exploración ( $t-exp$ )”. Al terminar la fase de exploración, el ratón fue confinado en la cámara central para iniciar la fase de socialización. La fase de socialización incluyó en una de las cámaras laterales la colocación de una jaula cilíndrica que contenía al ratón “desconocido”, mientras que en la otra cámara lateral se colocó una jaula cilíndrica vacía (objeto inanimado). Posterior a esto, las puertas laterales se retiraron, permitiendo al ratón de prueba recorrer libremente las tres cámaras por 10 minutos. Se cuantificó el tiempo que el roedor de prueba pasó interactuando con el sujeto desconocido y con el objeto inanimado, a este tiempo se le denominó “tiempo de interacción ( $t-int$ )”. Para calcular el grado de interacción ( $\Delta Tiempo$ ) se utilizó la siguiente fórmula:  $\Delta Tiempo = (t-int) - (t-exp)$  (Maldonado-Ruiz et al. 2021).



**Figura 8. Prueba de sociabilidad en tres cámaras.** Fases de la prueba de sociabilidad en tres cámaras

### 6.2.2.2. Entierro de canicas

Se utilizaron jaulas para ratón idénticas y se llenaron con 5 cm de aserrín limpio en donde se colocaron canicas estándar (15 mm de diámetro y 5.2 g de peso) dispuestas en cuatro filas de cuatro canicas cada una, separadas equitativamente unas de otras. Se



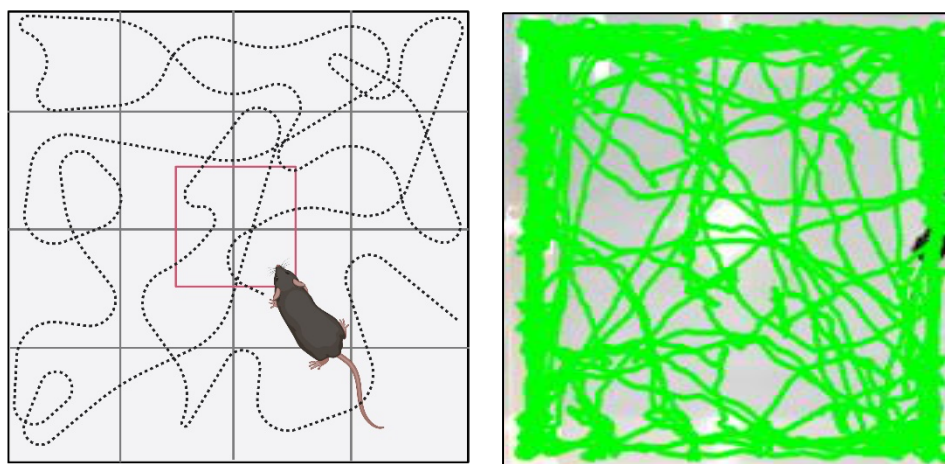
colocó al roedor de prueba en una esquina lo más alejada posible de las canicas y se cerró la jaula con tapas de cartón liso. Se le permitió al roedor de prueba interactuar con las canicas por 30 minutos y se cuantificó el número de canicas enterradas con aserrín en dos tercios de su superficie (Figura 9) (Maldonado-Ruiz et al. 2021).



**Figura 9. Prueba de entierro de canicas.** Distribución de canicas y determinación de canica enterrada (flecha roja) y canica no enterrada (flecha amarilla).

### 6.2.2.3. Campo abierto

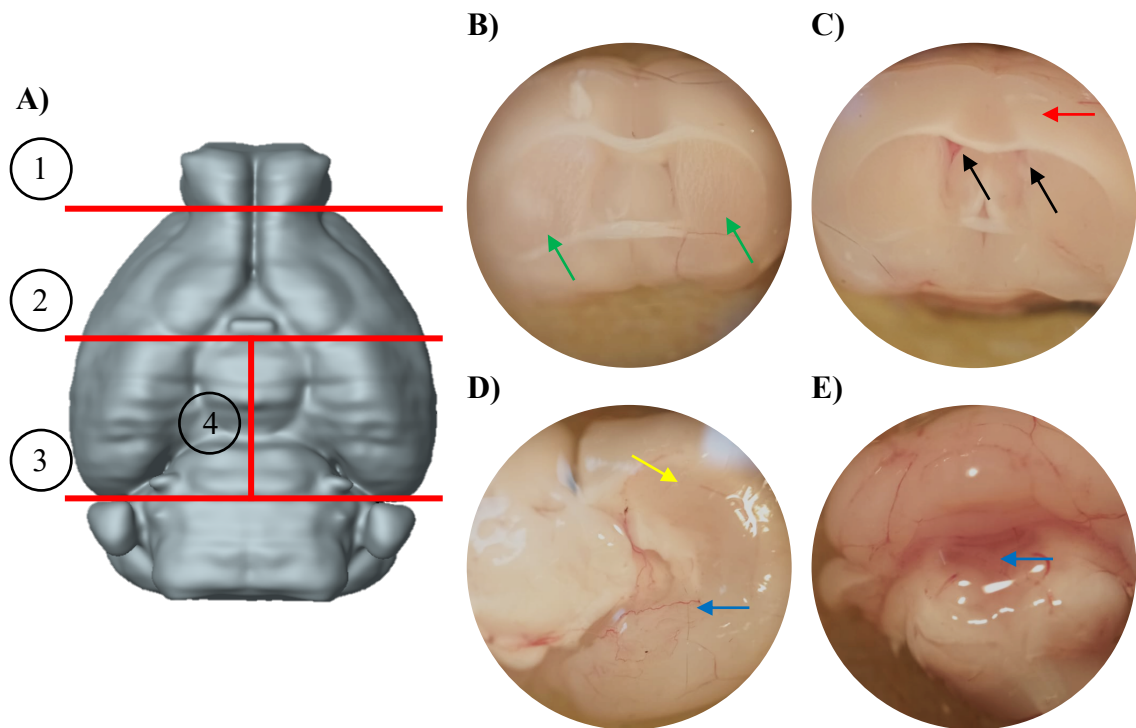
El roedor de prueba fue colocado en el interior de una cámara de acrílico, permitiéndosele recorrer la arena por 10 minutos y siendo toda la prueba grabada. Al finalizar cada sesión, se retiró al roedor y la arena se limpió con etanol al 70% antes de comenzar la prueba del siguiente roedor de prueba. Las grabaciones se analizaron con el software *ToxTrac*<sup>®</sup> [versión 2.84] (Figura 10) (Maldonado-Ruiz et al. 2021).



**Figura 10. Prueba de campo abierto.** Trayectoria recorrida en la prueba de campo abierto por ToxTrac<sup>®</sup>

### 6.2.3. Disección y recolección de tejido cerebral

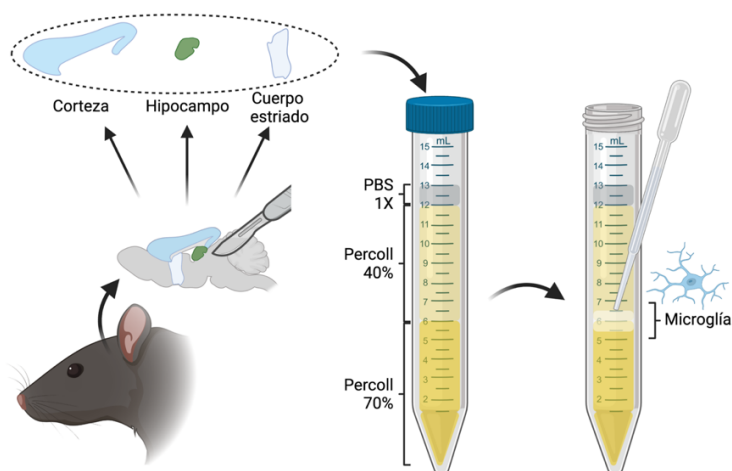
Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. La cabeza del ratón se expuso a etanol al 70% y se retiró la piel del cráneo para extraer el cerebro completo. Para la disección de las regiones cerebrales (corteza, hipocampo y cuerpo estriado) se retiraron los bulbos olfatorios y el cerebelo del cerebro. Posteriormente, se realizó un corte coronal aproximado a Bregma 0.02 mm (Figura 11A) para exponer la zona del cuerpo estriado (Figura 11B) y los ventrículos laterales (Figura 11C). Para exponer la zona del hipocampo se hizo un corte sagital sobre la fisura longitudinal para retirar el cerebro medio para luego extraer el hipocampo (Figura 11D) y el plexo coroideo de los ventrículos laterales y el cuarto ventrículo del cerebelo (Figura 11D-E). Para lograr alcanzar un porcentaje de recuperación celular eficiente que nos permita el análisis en el citómetro de flujo (ver abajo), se llevó a cabo la inclusión de 7-8 ratones por muestra única (pool) para cada región cerebral aislada que incluyó al plexo coroideo, la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. Todas las extracciones se almacenaron en tubos cónicos con 5 mL de PBS 1X.



**Figura 11. Metodología para disección cerebral.** A) Cortes realizados durante la disección del cerebro para la exposición y obtención de las regiones de interés con el orden en el número de cortes (1 – 4). Visualización estereoscópica de: B) el cuerpo estriado (flecha verde), C) los ventrículos laterales (flecha negra), la corteza (flecha roja), D) el hipocampo (flecha amarilla), el plexo coroideo (flecha azul), y E) el cerebelo.

#### 6.2.4. Aislamiento de poblaciones inmunes infiltrantes y células mononucleares.

Para este experimento se utilizaron las extracciones de las regiones cerebrales de la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado obtenidos previamente. Las muestras se centrifugaron a 1200 g por 5 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 mL de solución para digestión enzimática (colagenasa NB6 [2 mg/mL] (Nordmark Biochemicals, No. Catálogo: N0002779), dispasa II [2 mg/mL] (Sigma-Aldrich, No. Catálogo: D4693-1G), CaCl<sub>2</sub> [2mM], PBS 1X) durante 30 minutos a 37 °C en agitación. Posteriormente, se agregó un volumen de PBS 1X frío y se centrifugó a 1200 g por 5 minutos a 4 °C. Para las muestras de plexo coroideo, el precipitado se filtró con un filtro de 100 µm (Corning, No. Catálogo: 431752) y se centrifugó a 1500 g por 10 minutos a 4 °C, el precipitado se guardó a 4 °C hasta su utilización. Para las muestras de cada zona cerebral, los precipitados se resuspendieron en 2 mL de percoll (Sigma-Aldrich, No. Catálogo: P1644-100ML) al 70% y se fabricó el siguiente gradiente de percoll: 4 mL de percoll al 70%, 6 mL de percoll al 40% y 1 mL de PBS 1X, evitando que se mezclen las fases durante la adición del percoll. Los gradientes se centrifugaron a 1200 g por 45 minutos a 4 °C sin freno ni aceleración. Se recuperó el halo que se formó en la interfase del gradiente (aproximadamente a los 6 mL estará la microglía) (Figura 12), se aforó a 14 mL con PBS 1X y se centrifugó a 1500 g por 10 minutos a 4 °C. El precipitado se guardó a 4 °C y se procedió al marcaje con anticuerpos primarios.



**Figura 12. Gradiente de densidad de Percoll.** Se diseccionaron las zonas de corteza, hipocampo y cuerpo estriado de 7–8 ratones para la creación de pools únicos de células. Para la creación del gradiente primero se añaden 6 ml de Percoll 70%, luego 6 ml de Percoll 40% y por último 1 ml de PBS 1X (tubo de la izquierda). Posterior a finalizar los tiempos de centrifugación, la microglía estará aproximadamente en la interfase, entre los porcentajes 70-40 del gradiente (tubo de la derecha).

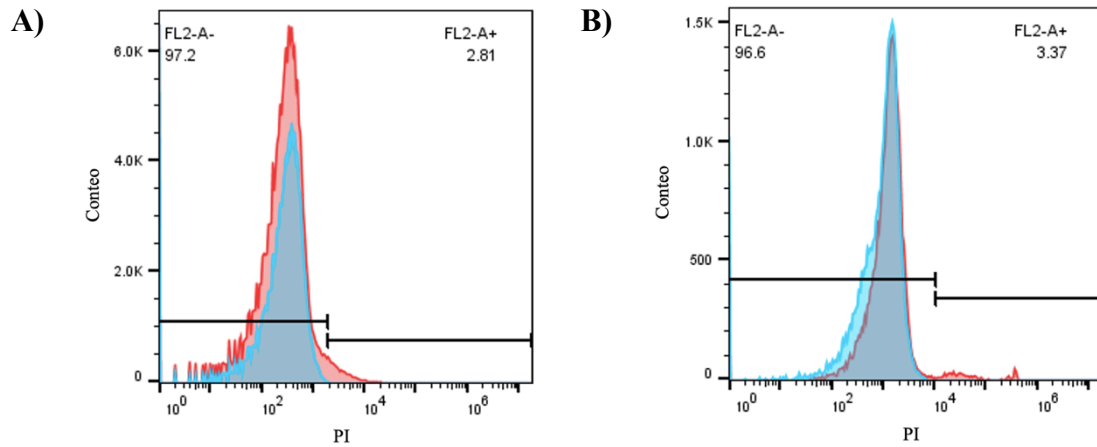
### **6.2.5. Determinación de poblaciones inmunes infiltrantes y fenotipo microglial.**

Las muestras obtenidas en el punto anterior se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos primarios anti-NK1.1-APC (BD Pharmingen, No. Catálogo: 550627) y Anti-IgG2a  $\kappa$ -APC isotype (BD Pharmingen, No. Catálogo: 553932) para la determinación de células NK, anti-CD11c-PE (BD Pharmingen, No. Catálogo: 557401) y Anti-IgG1  $\lambda$ 1-PE isotype (BD Pharmingen, No. Catálogo: 553954) para la determinación de células dendríticas y anti-CD11b-FITC (Miltenyi Biotec, No. Catálogo: 130-113-796), anti-CD45-PE: Cy5 (BD Pharmingen, No. Catálogo: 557401) y Anti-IgG2b  $\kappa$ -PE-Cy 5 isotype (BD Pharmingen, No. Catálogo: 553990) para la determinación de células de microglía, macrófagos y linfocitos.

Para la diferenciación del fenotipo microglial M1/M2 se utilizaron anticuerpos primarios anti-CD86-APC (BD Pharmingen, No. Catálogo: 561870) y Anti-IgG2a  $\kappa$ -APC isotype (BD Pharmingen, No. Catálogo: 550882) para la determinación del fenotipo M1 y anti-CD206-FITC (Biolegend, No. Catálogo: 141703) para la determinación del fenotipo M2. Se utilizó yoduro de propidio (PI) (Invitrogen, No. Catálogo: P3566) para la determinación de la viabilidad (Figura 13).

Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 1:100. Se agregó un volumen de PBS 1X a la muestra y se centrifugó a 1200 g por 5 minutos a 4 °C, el pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ L de PBS 1X para el posterior análisis de citometría de flujo.

Se utilizó un BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer BD Biosciences y los resultados fueron analizados por el software FlowJo [versión 10.8.1], el citómetro utiliza tubos fotomultiplicadores con canales fluorescentes (FL) para determinar la fluorescencia emitida. Para la detección del marcador se utilizaron los canales de FL-1, FL-2, FL-3 y FL-4.



**Figura 13. Porcentajes de muerte celular.** Histogramas de las muestras de **A)** plexo coroideo y **B)** regiones cerebrales. Podemos observar que en las muestras se obtuvo un porcentaje general de viabilidad aproximado al 97% y un porcentaje general de muerte aproximado al 3%. Rojo = células marcadas con PI, Azul = células sin marcaje.

### 6.2.6. Análisis estadístico.

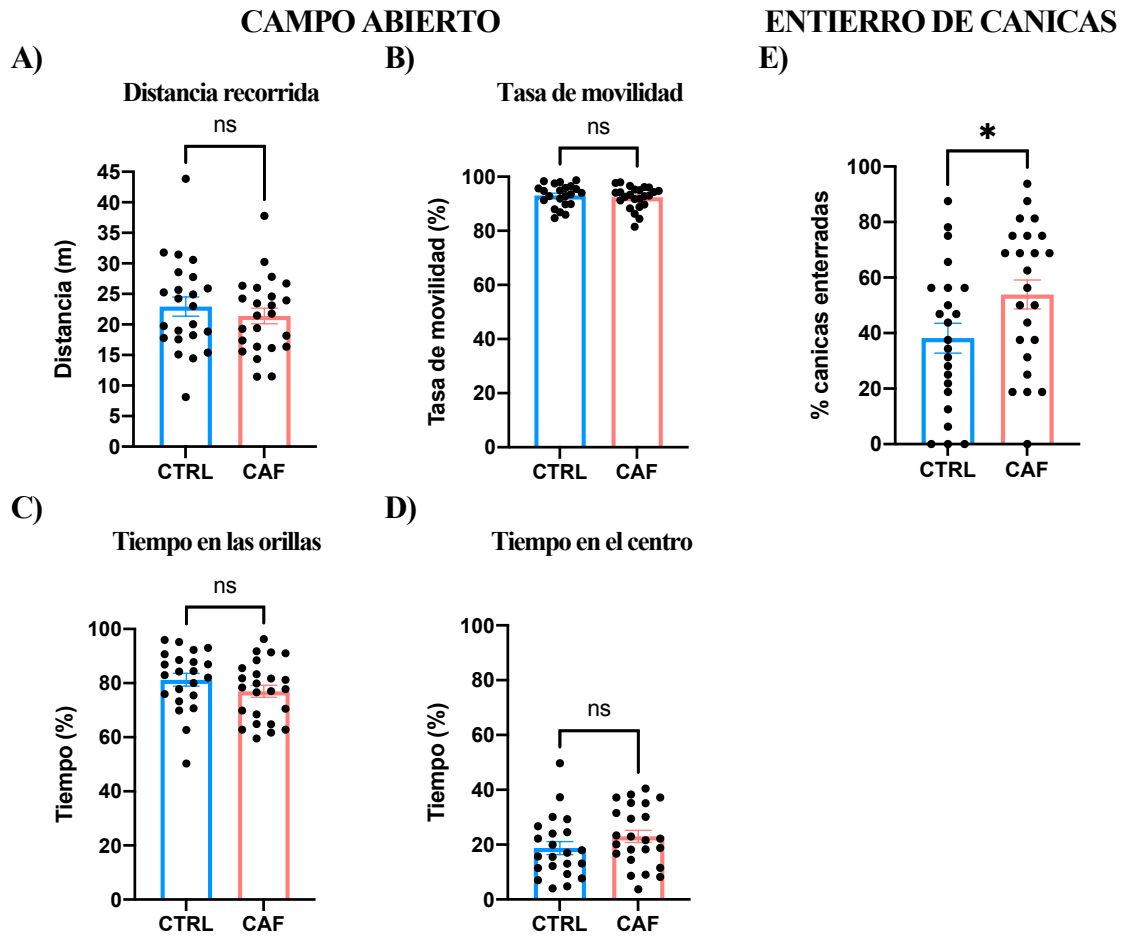
Se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk seguido de una prueba de ROUT (10%) para el análisis y la determinación de datos atípicos. Para descartar datos atípicos se tomaron en cuenta los resultados de la prueba de ROUT y los resultados del QQ plot. Se utilizó la prueba de comparación de medias para datos independientes t de Student. El programa estadístico empleado fue el software Prism – GraphPad [versión 9.0.1].

## 7. RESULTADOS

### 7.1. La descendencia de ratones expuestos a dieta cafetería presentan conducta similar al TEA

La primera parte de este proyecto consistió en demostrar que el consumo de dieta cafetería (CAF) durante el embarazo y la lactancia promueve conductas similares al TEA en la descendencia. Para evidenciar los efectos negativos de la dieta CAF sobre la descendencia, utilizamos tres pruebas conductuales: campo abierto, entierro de canicas y sociabilidad en tres cámaras. En particular, la prueba de campo abierto la utilizamos para determinar el comportamiento locomotor y el comportamiento similar a la ansiedad. Nuestros resultados indican que no se observan diferencias significativas en su comportamiento locomotor evidenciado por la distancia recorrida y la tasa de movilidad de la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF comparado con sujetos control (Figura 14A-B). Además, tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de tiempo que pasa la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF en las orillas o en el centro de la arena (Figura 14C-D), confirmando que no presenta un criterio de ansiedad.

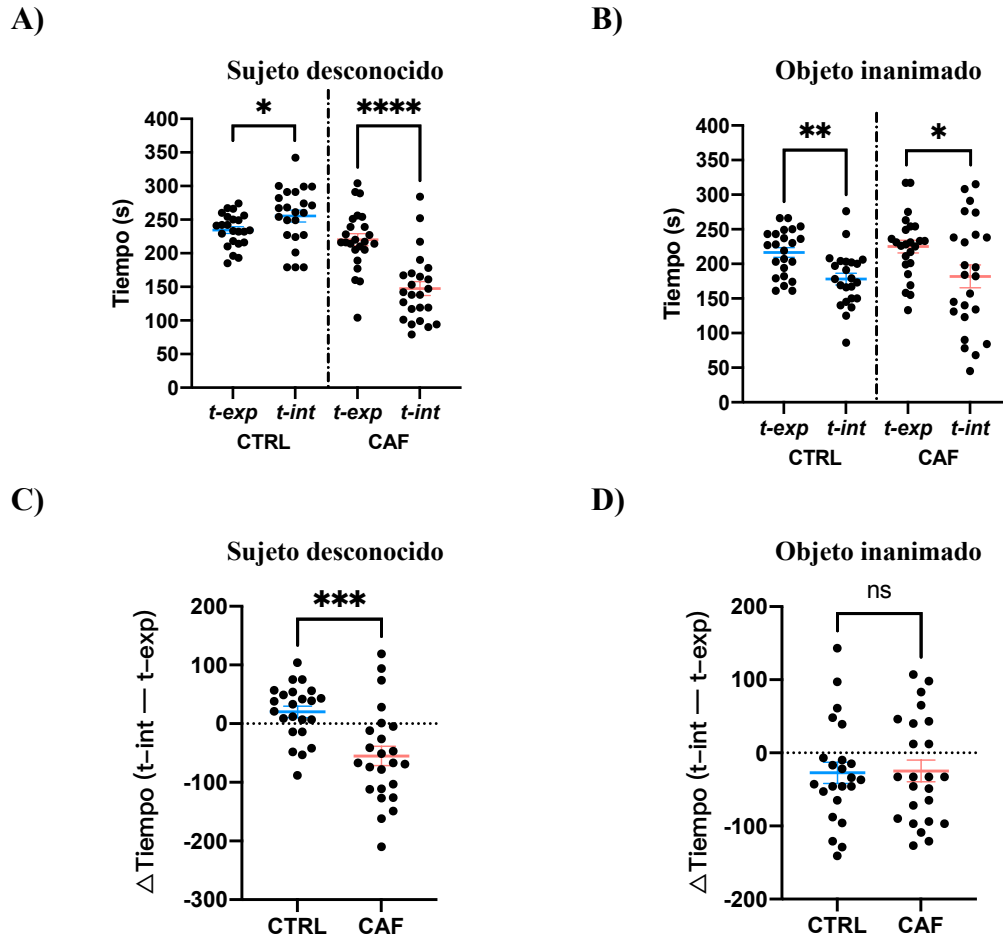
En el siguiente experimento se evaluó la presencia de conductas repetitivas-estereotipadas mediante la prueba de entierro de canicas. Las conductas repetitivas-estereotipadas es uno de los principales rasgos conductuales del TEA. Nuestros resultados indican que la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF entierran más canicas en comparación con la descendencia de madres alimentadas con dieta CTRL (Figura 14E). Por lo tanto, la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF presentan comportamientos repetitivos-estereotipados.



**Figura 14. Desempeño de la descendencia en campo abierto y entierro de canicas.** **A)** Distancia total recorrida en metros del grupo CTRL y CAF (CTRL  $n = 23$ ,  $22.93 \pm 1.58$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $21.40 \pm 1.27$  SEM). **B)** Tasa de movilidad en porcentaje del grupo CTRL y CAF (CTRL  $n = 22$ ,  $93.07 \pm 0.87$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $92.41 \pm 0.84$  SEM). **C)** Tiempo en las orillas en porcentaje del grupo CTRL y CAF (CTRL  $n = 22$ ,  $81.24 \pm 2.38$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $76.98 \pm 2.22$  SEM). **D)** Tiempo en el centro en porcentaje del grupo CTRL y CAF (CTRL  $n = 22$ ,  $18.76 \pm 2.38$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $23.02 \pm 2.22$  SEM). **E)** Porcentaje de canicas enterradas del grupo CTRL y CAF (CTRL  $n = 23$ ,  $38.18 \pm 5.35$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $53.91 \pm 5.24$  SEM). Los gráficos muestran los datos normalizados de la media  $\pm$  SEM; t de Student para datos independientes, ns = no significativo, \* $p < 0.05$ .

Finalmente, se realizó la prueba de sociabilidad en tres cámaras para evaluar la interacción del ratón con un individuo de su misma especie. Esta prueba se basa en el hecho de que los ratones, al ser animales sociales, prefieren interactuar más tiempo con un sujeto desconocido de su misma especie comparado con la interacción con un objeto inanimado, a este comportamiento se le denomina sociabilidad. El déficit en la sociabilidad es un rasgo conductual clave del TEA. Nuestros resultados indican que la descendencia de madres alimentadas con dieta CTRL muestran un incremento en el tiempo con el sujeto desconocido y una reducción en el tiempo con el objeto inanimado (Figura 15A-B). Por otra parte, la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF muestran una reducción en el tiempo que pasan con el sujeto desconocido y una reducción en el tiempo que pasan con el objeto inanimado (Figura 15A-B). Al analizar el grado de interacción de los grupos, nuestros resultados muestran que la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF presentan un grado de interacción menor con el sujeto desconocido en comparación con la descendencia de madres alimentadas con dieta CTRL (Figura 15C). No se observan diferencias significativas en el grado de interacción de los sujetos de prueba con el objeto inanimado en ninguno de los grupos (Figura 15D). Los resultados sugieren que la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF presenta déficit en la interacción social.

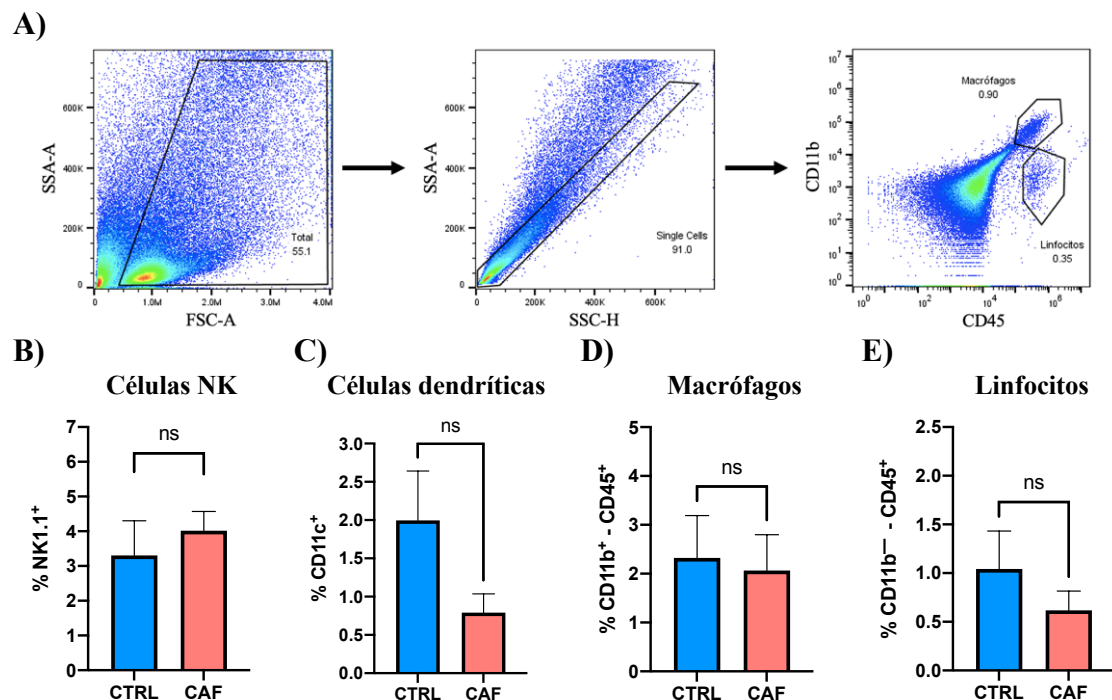




**Figura 15. Desempeño de la descendencia en sociabilidad en tres cámaras.** **A)** Tiempo en segundos que pasaron los ratones CTRL y CAF durante la fase de exploración (*t-exp*) e interacción (*t-int*) cuando se colocó el sujeto desconocido (CTRL  $n = 23$ ,  $t\text{-exp} 234.5 \pm 5.08$  SEM,  $t\text{-int} 255.3 \pm 8.96$  SEM; CAF  $n = 24$ ;  $t\text{-exp} 220.1 \pm 9.08$  SEM,  $t\text{-int} 147.5 \pm 10.42$  SEM). **B)** Tiempo en segundos que pasaron los ratones CTRL y CAF durante la fase de exploración (*t-exp*) e interacción (*t-int*) cuando se colocó el objeto inanimado (CTRL  $n = 23$ ,  $t\text{-exp} 216.5 \pm 7.03$  SEM,  $t\text{-int} 178.0 \pm 8.41$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $t\text{-exp} 225.0 \pm 9.28$  SEM,  $t\text{-int} 182.0 \pm 16.39$  SEM). **C)** Grado de interacción de los ratones CTRL y CAF con el sujeto desconocido (CTRL  $n = 23$ ,  $20.09 \pm 9.73$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $-55.04 \pm 16.44$  SEM). **D)** Grado de interacción de los ratones CTRL y CAF con el objeto inanimado (CTRL  $n = 23$ ,  $-27.30 \pm 14.56$  SEM; CAF  $n = 24$ ,  $-24.71 \pm 14.75$  SEM). Los gráficos muestran los datos normalizados de la media  $\pm$  SEM; t de Student para datos independientes, ns = no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

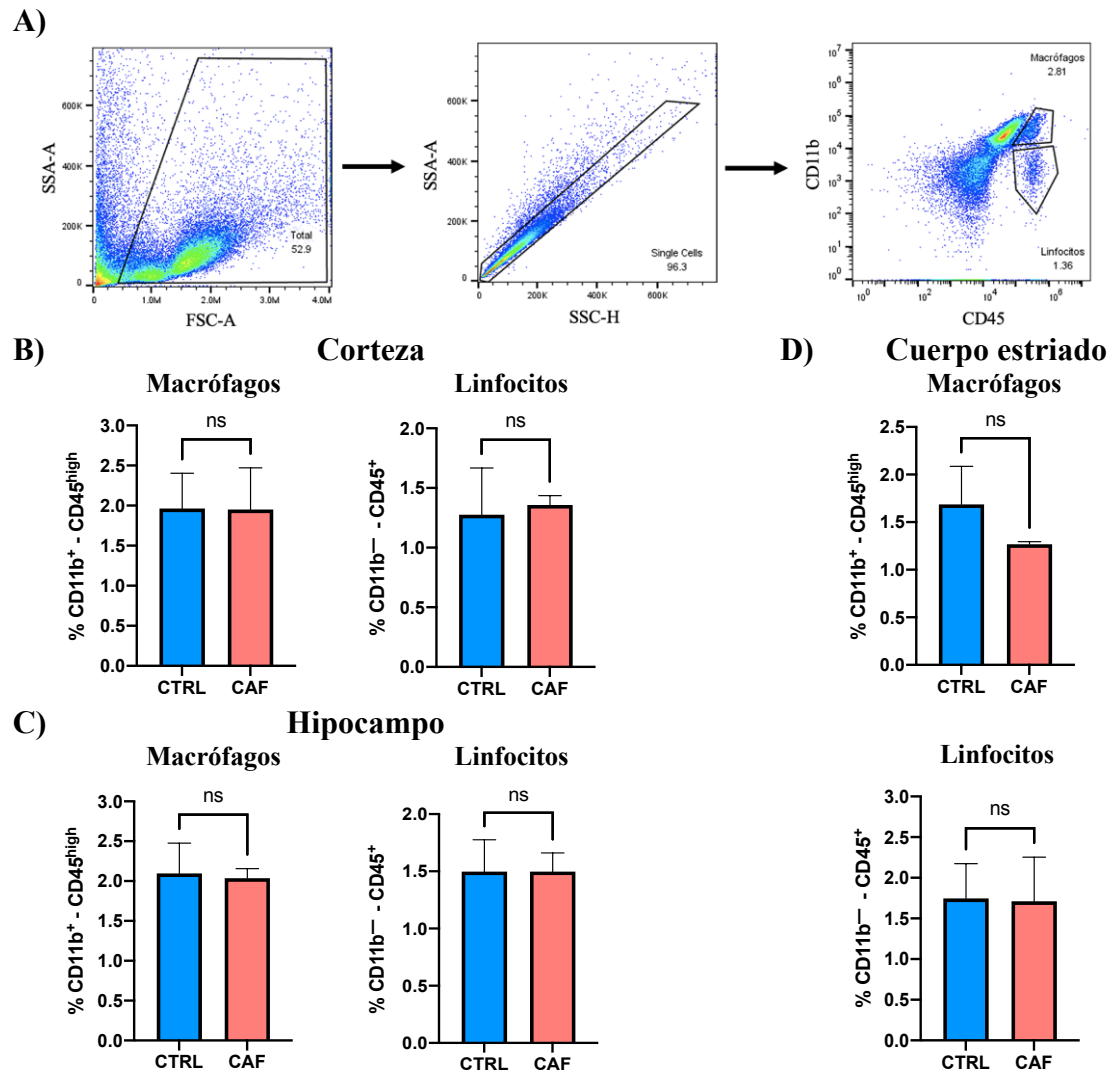
## 7.2. La programación nutricional por dieta cafetería no promueve infiltración de células inmunitarias al cerebro de la descendencia

Posterior a la determinación de la conducta similar al TEA en la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF, se identificó la infiltración de células inmunes al plexo coroideo de los sujetos de estudio. Utilizamos el análisis de citometría de flujo para la determinación de células NK (NK1.1<sup>+</sup>), células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>), macrófagos (CD11b<sup>+</sup> - CD45<sup>+</sup>) y linfocitos (CD11b<sup>-</sup> - CD45<sup>+</sup>). La estrategia de *gating* se basó en seleccionar la población origen (SSA-A:FSC-A), la selección de células individuales (SSA-A:SSA-H) y la verificación del marcaje celular de interés (Figura 16A). Nuestros resultados muestran que el plexo coroideo de la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF no presenta cambios significativos en los porcentajes de células NK, células dendríticas, macrófagos y linfocitos (Figura 16B-E).



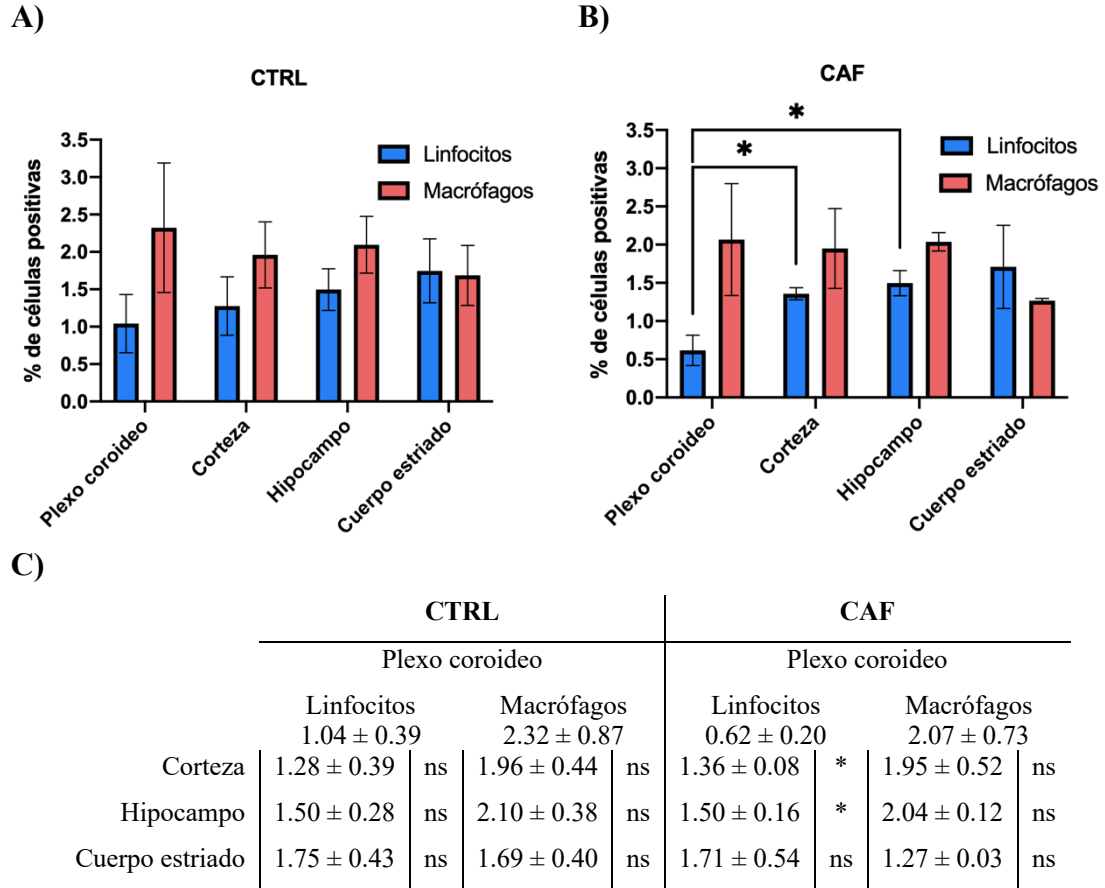
**Figura 16. Células inmunes infiltrantes en plexo coroideo.** A) Estrategia de *gating* para la determinación de células NK (NK1.1<sup>+</sup>), células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>), macrófagos (CD11b<sup>+</sup> - CD45<sup>+</sup>) y linfocitos (CD11b<sup>-</sup> - CD45<sup>+</sup>) en muestras de plexo coroideo. Porcentaje de células positivas para **B)** células NK (CTRL = 3.30 ± 0.99 SEM; CAF = 4.02 ± 0.55 SEM), **C)** células dendríticas (CTRL = 2.00 ± 0.64 SEM; CAF = 0.79 ± 0.24 SEM), **D)** macrófagos (CTRL = 2.32 ± 0.87 SEM; CAF = 2.07 ± 0.73 SEM) y **E)** linfocitos (CTRL = 1.04 ± 0.39 SEM; CAF = 0.62 ± 0.20 SEM) en los grupos CTRL y CAF. Los gráficos muestran los datos normalizados de la media ± SEM; CTRL (n = 3), CAF (n = 3); t de Student para datos independientes, ns = no significativo.

De igual manera, determinamos el efecto de la programación nutricional por dieta CAF en la infiltración de células inmunes en regiones cerebrales de importancia para el TEA, que incluyen a la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. Utilizamos el análisis de citometría de flujo para la determinación de macrófagos ( $CD11b^+ - CD45^{high}$ ) y linfocitos ( $CD11b^- - CD45^+$ ). Siguiendo una estrategia de *gating* igual a la muestra anterior (Figura 17A), nuestros resultados muestran que las regiones cerebrales de la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF no presentan cambios significativos en los porcentajes de macrófagos y linfocitos (Figura 17B-D).



**Figura 17. Células inmunes infiltrantes en regiones cerebrales.** A) Estrategia de *gating* para la determinación de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>-CD45<sup>high</sup>) y linfocitos (CD11b<sup>-</sup>-CD45<sup>+</sup>) en regiones cerebrales. Porcentaje de células positivas para macrófagos y linfocitos en **B)** corteza (macrófagos: CTRL = 1.96 ± 0.44 SEM, CAF = 1.95 ± 0.52 SEM; linfocitos: CTRL = 1.28 ± 0.39 SEM, CAF = 1.36 ± 0.08 SEM), **C)** hipocampo (macrófagos: CTRL = 2.10 ± 0.38 SEM, CAF = 2.04 ± 0.12 SEM; linfocitos: CTRL = 1.50 ± 0.28 SEM, CAF = 1.50 ± 0.16 SEM) y **D)** cuerpo estriado (macrófagos: CTRL = 1.69 ± 0.40 SEM, CAF = 1.27 ± 0.03 SEM; linfocitos: CTRL = 1.75 ± 0.43 SEM, CAF = 1.71 ± 0.54 SEM) en los grupos CTRL y CAF. Los gráficos muestran los datos normalizados de la media ± SEM; CTRL (n = 3), CAF (n = 3); t de Student para datos independientes, ns = no significativo.

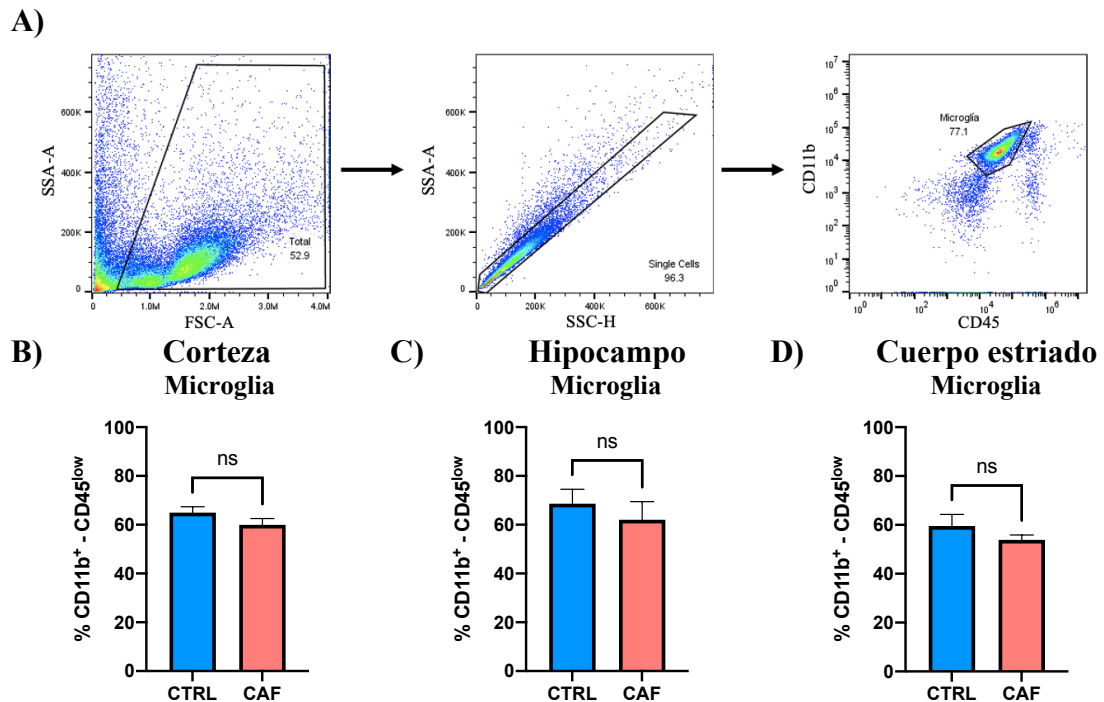
Adicional a lo anterior, decidimos comparar los niveles de infiltración de macrófagos ( $CD11b^+ - CD45^+$ ) y linfocitos ( $CD11b^- - CD45^+$ ) presentes en el plexo coroideo comparado con el observado en las regiones cerebrales de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado de la descendencia de madres alimentadas con dieta CTRL y CAF. Nuestros resultados muestran que la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF existen diferencias significativas entre los porcentajes de células positivas a linfocitos en el plexo coroideo en comparación con la corteza y el hipocampo (Figura 18B), sin observar diferencias significativas entre todos los demás grupos en los porcentajes de células positivas entre plexo coroideo-regiones anatómicas de estudio en la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF y CTRL (Figura 18A-C).



**Figura 18. Linfocitos y macrófagos infiltrantes por región anatómica.** Comparaciones en los niveles de infiltración de linfocitos y macrófagos entre todas las regiones anatómicas de estudio (plexo coroideo, corteza, hipocampo, cuerpo estriado) en los grupos **A) CTRL** y **B) CAF**. **C)** Datos estadísticos de las comparaciones de los niveles de infiltración de linfocitos y macrófagos entre todas las regiones anatómicas de estudio. Los gráficos y la tabla muestran los datos normalizados de la media  $\pm$  SEM; CTRL (n = 3), CAF (n = 3); t de Student para datos independientes, ns = no significativo, \* $p < 0.05$ .

### 7.3. La programación nutricional por dieta cafetería no favorece cambios en la densidad ni en los fenotipos M1/M2 de la microglía

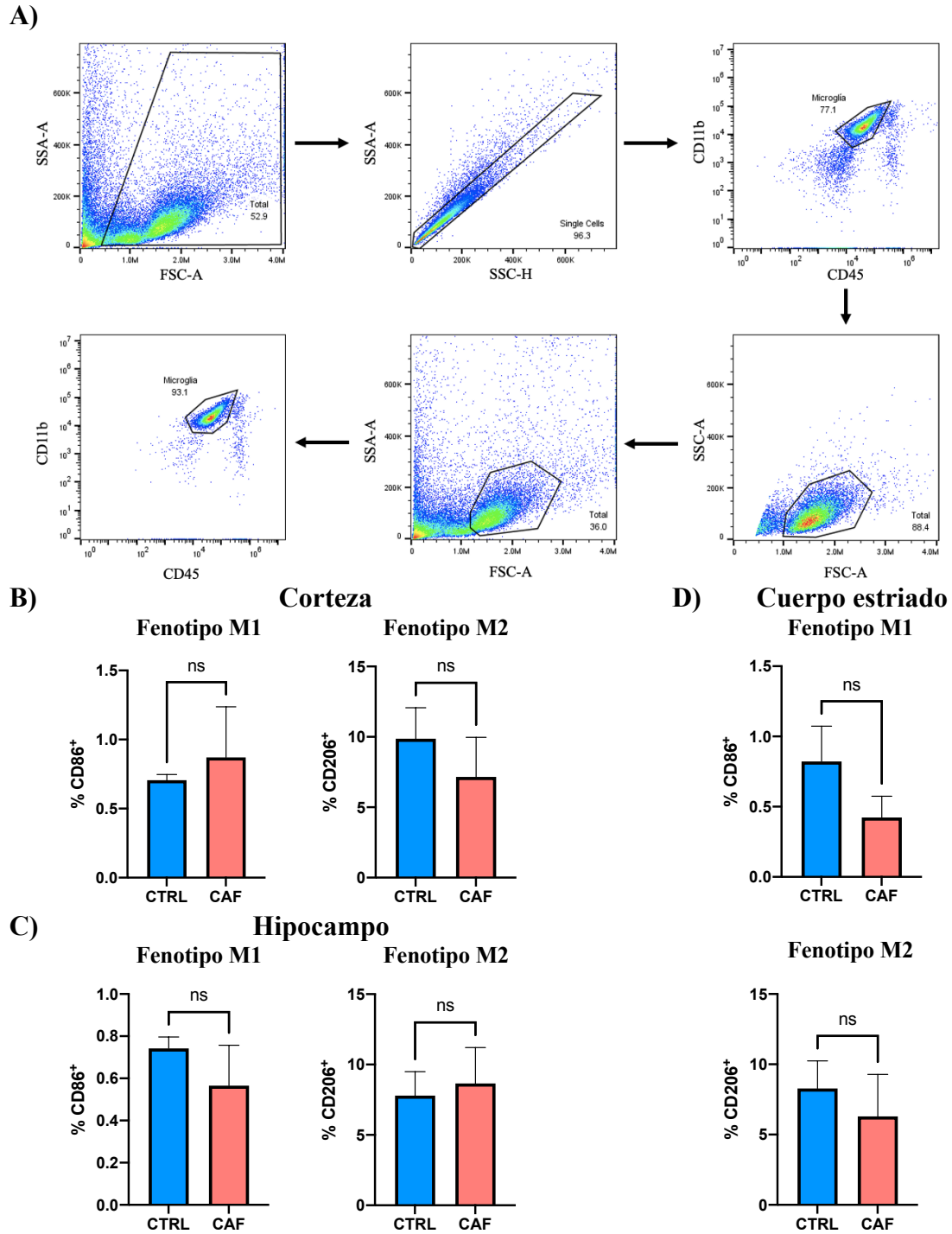
Posterior a determinar los niveles de infiltración en plexo coroideo y regiones cerebrales, procedimos a determinar si la programación nutricional por dieta CAF favorecía cambios en la densidad microglial de regiones cerebrales de importancia para el TEA. Utilizamos el análisis de citometría de flujo para la determinación de los porcentajes de microglía total ( $CD11b^+ - CD45^{low}$ ) en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. La estrategia de *gating* se basó en seleccionar nuestra población origen (SSA-A:FSC-A) para después seleccionar solamente las células individuales (SSA-A:SSC-H) y finalmente checar sobre esas células el marcaje para microglía (Figura 19A). Nuestros resultados indican que la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF no presenta cambios significativos en los porcentajes de microglía (Figura 19B-D) en la corteza cerebral, el hipocampo ni en el cuerpo estriado de los sujetos.



**Figura 19. Microglía en regiones cerebrales.** A) Estrategia de *gating* para la determinación de células de microglía ( $CD11b^+ - CD45^{low}$ ) en regiones cerebrales. Porcentaje de células positivas para microglía en **B)** corteza (CTRL =  $64.93 \pm 2.43$  SEM; CAF =  $59.93 \pm 2.57$  SEM), **C)** hipocampo (CTRL =  $68.60 \pm 5.94$  SEM; CAF =  $62.00 \pm 7.48$  SEM) y **D)** cuerpo estriado (CTRL =  $59.50 \pm 4.80$  SEM; CAF =  $53.90 \pm 1.95$  SEM) en los grupos CTRL y CAF. Los gráficos muestran los datos normalizados de la media  $\pm$  SEM; CTRL (n = 3), CAF (n = 3); t de Student para datos independientes, ns = no significativo.

Por último, determinamos el efecto de la programación nutricional por dieta CAF en el fenotipo M1 (proinflamatorio) o M2 (antiinflamatorio) de la microglia en regiones cerebrales de importancia para el TEA. Utilizamos el análisis de citometría de flujo para la determinación de los porcentajes de microglia con fenotipo M1 (CD86<sup>+</sup>) y M2 (CD206<sup>+</sup>) en las regiones de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. La estrategia de *gating* se basó en seleccionar nuestra población origen (SSA-A:FSC-A) y seleccionar solamente las células individuales (SSA-A:SSA-H) para el marcaje correspondiente a microglía, posteriormente se realizó un *gate* inverso para determinar donde se localizaba la mayor cantidad de microglía, reajustar el *gate* inicial y finalmente y checar sobre esas células el marcaje correspondiente a los fenotipos M1/M2 (Figura 20A). Nuestros resultados indican que la descendencia de madres alimentadas con dieta CAF no presentan cambios significativos en los fenotipos M1/M2 de la microglía en las regiones de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado (Figura 20B-D).





**Figura 20. Fenotipo microglial en regiones cerebrales.** A) Estrategia de *gating* para la determinación del fenotipo microglial M1 (CD86<sup>+</sup>) o M2 (CD206<sup>+</sup>) en regiones cerebrales. Porcentaje de células positivas para fenotipo M1 y M2 en **B)** corteza (M1: CTRL = 0.70 ± 0.04 SEM, CAF = 0.87 ± 0.37 SEM; M2: CTRL = 9.87 ± 2.20 SEM, CAF = 7.16 ± 2.81 SEM), **C)** hipocampo (M1: CTRL = 0.74 ± 0.05 SEM, CAF = 0.56 ± 0.19 SEM; M2: CTRL = 7.80 ± 1.69 SEM, CAF = 8.65 ± 2.56 SEM) y **D)** cuerpo estriado (M1: CTRL = 0.82 ± 0.25 SEM, CAF = 0.42 ± 0.15 SEM; M2: CTRL = 8.29 ± 1.95 SEM, CAF = 6.29 ± 2.99 SEM) en los grupos CTRL y CAF. Los gráficos muestran los datos normalizados de la media ± SEM; CTRL (n = 3), CAF (n = 3); t de Student para datos independientes, ns = no significativo.

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo contribuimos a determinar si la programación fetal por exposición a dieta con alto contenido energético favorece la conducta similar al TEA en la descendencia que correlaciona con una mayor infiltración de células inmunes en el cerebro y marcaje positivo de microglía M1, confirmando un perfil proinflamatorio.

Estudios epidemiológicos en humanos y modelos animales preclínicos han confirmado que la exposición prenatal a una dieta alta en grasa o la presencia de obesidad materna predispone a la descendencia a presentar desórdenes del neurodesarrollo que incluyen a la discapacidad intelectual, defectos en el aprendizaje y la memoria (Abbott et al. 2019; Lee et al. 2021), y trastornos conductuales, que incluyen al trastorno por déficit de atención con hiperactividad (Fernandes et al. 2012; Li et al. 2020), depresión (Rodríguez 2010; Trujillo-Villarreal et al. 2021) y el TEA (Maldonado-Ruiz et al. 2021; Qiu et al. 2018). Nuestros resultados confirman que la descendencia de ratones alimentados con dieta cafetería exhibe un comportamiento similar al autismo (Maldonado-Ruiz et al. 2021), evidenciado por la presencia de 2 rasgos conductuales del autismo: comportamientos repetitivos-estereotipados (Figura 14E) y déficits en la interacción social (Figura 15C) (Cai et al. 2019), sin presentar alteraciones en el comportamiento locomotor (Figura 14A-B). Nuestros resultados muestran que la descendencia de ratones alimentados con dieta cafetería no presentan un comportamiento similar a la ansiedad (Figura 14C-D), sin embargo, existen reportes en donde confirman disminución (Balsevich et al. 2016; Sasaki et al. 2014; Winther et al. 2018), o aumento (Maldonado-Ruiz et al. 2021; Wong et al. 2019; Xu et al. 2021) de la conducta similar a la ansiedad en modelos animales con un fenotipo de TEA.

Aunque aún se encuentra en investigación, se ha demostrado que el efecto de la exposición prenatal a eventos adversos como la obesidad materna, o bien, la exposición a dieta con alto contenido energético favorece alteraciones conductuales dependientes del tiempo. Por ejemplo, ratones jóvenes (3 meses de edad) podrían no exhibir alteraciones conductuales, mientras que a largo plazo (12 meses de edad) pueden manifestarse (Winther et al. 2018). Se piensa que este efecto es fruto de la combinación de factores como el entorno prenatal, la exposición ambiental, las experiencias individuales

posteriores al nacimiento e incluso el envejecimiento (Winther et al. 2018). Nuestros resultados y otros estudios con modelos murinos de TEA han demostrado un aumento en el número de canicas enterradas (Figura 14E) (Maldonado-Ruiz et al. 2021; Santana-Santana et al. 2021; Wong et al. 2019), mientras que algunos otros autores documentan decremento en el entierro de canicas (Moy et al. 2014; Xu et al. 2021). En estos estudios se observa que el porcentaje total de canicas varía en muchos de ellos, no siendo consistente un porcentaje promedio de canicas enterradas, posiblemente por la variabilidad de parámetros que se pueden modificar en la prueba (número de canicas, tiempos de prueba, consideraciones de canica enterrada). En previos estudios de nuestro laboratorio, documentamos que la descendencia de ratones alimentados con dieta cafetería que exhibe comportamientos repetitivos-estereotipados enterraron 20% más canicas que la descendencia CTRL, (Chen et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2021; Xiao et al. 2021), lo cual concuerda con estudios anteriormente citados (Angoa-Pérez et al. 2013). Estos datos sugieren que a pesar de las modificaciones que pueden existir en el diseño de cada prueba conductual de entierro de las canicas, los resultados coinciden en la alteración de la conducta repetitiva a enterrar o no enterrar las canicas en comparación con el grupo control. Por su parte, la prueba de sociabilidad en tres cámaras es considerada una prueba “*gold standard*” para la determinación de la sociabilidad (interacción social) en modelos con un fenotipo de TEA (Barbera et al. 2020). Nuestros resultados corroboran la disminución de la interacción social (Figura 15B), reportado por otros investigadores (Chen et al. 2020; Maldonado-Ruiz et al. 2021; Xiao et al. 2021), siendo este parámetro uno de los más reproducibles e importantes en modelos con un fenotipo de TEA. En su conjunto, nuestro esquema de análisis conductual nos permitió identificar dos criterios de conducta incluyente en el TEA que se favorece por la exposición de dietas con alto contenido calórico en los ratones, comportamientos repetitivos-estereotipados y déficit en la interacción social.

El TEA es un trastorno del neurodesarrollo que integra interacciones genéticas, ambientales y del sistema inmune en etapas tempranas de la vida (Asociación Americana de Psiquiatría 2014). En específico, la contribución de la neuroinflamación cerebral y/o la infiltración de poblaciones inmunes celulares al cerebro en el desarrollo y/o

susceptibilidad del TEA aún no está del todo esclarecida. Se conoce que la infiltración de células inmunes está presente en individuos con enfermedades como el Alzheimer (Togo et al. 2002) y en TEA (DiStasio et al. 2019), en donde podrían potencialmente contribuir a la disrupción de la barrera hematoencefálica, promoviendo neuroinflamación e inclusive, interactuar y activar a la microglia residente en el cerebro (Chen et al. 2022; Qiu et al. 2021). En modelos animales se ha observado que la infiltración de células inmunes como los monocitos pueden promover conductas similares al autismo, además de neuroinflamación cerebral (Chen et al. 2020, 2022). Esta propuesta se confirma en la descendencia de modelos animales que fueron expuestos a la MIA, simulando un estímulo inmune en la madre durante periodos críticos del desarrollo y promoviendo la infiltración inmune celular en regiones cerebrales y la manifestación de conductas aberrantes en la descendencia (Cui et al. 2020).

Nuestros resultados muestran que la descendencia de ratones alimentados con dieta cafetería presenta una mayor infiltración de células de linfocitos en la corteza cerebral y el hipocampo en comparación con el plexo coroideo (Figura 18B). Con anterioridad se ha demostrado que la infiltración de linfocitos puede estar presente en zonas como el plexo coroideo y las venas de las meninges (Louveau et al. 2017), además de en cerebros de individuos con autistas (DiStasio et al. 2019). En condiciones patológicas, los linfocitos junto con leucocitos infiltrantes se les ha atribuido la capacidad de producir mayores cantidades de ROS, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , moléculas con la capacidad de promover procesos de fagocitosis sobre la mielina, daño oligodendrogial y lesión neuronal axonal (Ortiz et al. 2014). La evidencia señala que el consumo de dietas altas en grasas y comorbilidades como la obesidad favorecen la infiltración de las células inmunes hacia el cerebro (Buckman et al. 2014; Lainez et al. 2018), sin embargo, la evidencia de infiltración inmune celular durante eventos de programación fetal es más escasa. Se ha reportado que en modelos de diabetes materna, la descendencia de estas madres presentan mayor infiltración de macrófagos acompañado de una disminución en el número de células neuronales (Liang et al. 2019). La evidencia también apunta a que la infiltración tener su origen en etapas gestacionales, exclusivamente presentando inflamación subcrónica a nivel de placenta-feto. De hecho, se conoce que la exposición materna a IL-1 $\beta$  (citocina incrementada en modelos de programación fetal por exposición a dietas

calóricas) puede afectar el flujo sanguíneo placenta-feto, aumentando la infiltración de células T-CD4<sup>+</sup> y T-CD8<sup>+</sup> favoreciendo la activación del sistema inmunitario y fenotipos neuroconductuales adversos en la descendencia (Novak et al. 2019).

Una segunda explicación de los bajos niveles de la infiltración de poblaciones inmunes al cerebro de la descendencia expuesta a dieta CAF, pudiera estar relacionada con la “hipótesis del segundo estímulo” (*second hit*). Esta hipótesis propone que la susceptibilidad genética de cada individuo (primer estímulo) puede prepararlos para ser más susceptibles a estímulos ambientales desfavorables (segundo estímulo) como la sobrenutrición y la inflamación materna, y de esta manera consolidar fenotipos adversos tales como el TEA o la esquizofrenia. (Cattane et al. 2020; Guerrin et al. 2021; Rauschenberger et al. 2021). En este sentido, se comprobó que la programación fetal por exposición a madres expuestas a partículas de escape de diésel y la exposición posterior a dieta alta en grasa (modelo *second hit*), incrementa el marcaje de células inmunes infiltrantes (macrófagos) al combinar las zonas del hipotálamo e hipocampo (Bolton et al. 2014). Esta evidencia podría explicar por qué la ausencia de un segundo estímulo posterior al nacimiento presente en nuestro modelo, no exhibe cambios significativos del porcentaje de infiltración de células inmunes en las regiones cerebrales.

Una segunda aportación de este estudio demuestra que ratones expuestos a dieta cafetería no exhibe cambios en la densidad microglial (Figura 19B-D) ni cambios en los fenotipos M1/M2 de la microglía (Figura 20B-D). El TEA se han asociado con cambios en la morfología microglial, promoción de un perfil proinflamatorio (M1) y cambios en la densidad microglial asociados a las alteraciones del desarrollo cerebral (Bordeleau et al. 2021; Siniscalco et al. 2018). Si bien existe evidencia de que los ácidos grasos saturados pueden activar vías proinflamatorias en la microglia de la descendencia (Lancaster et al. 2018) e incluso monocitos infiltrantes adaptar características de una microglia patológica (Chen et al. 2022), la inflamación crónica de bajo grado y la ausencia de un segundo estímulo en un cerebro predispuesto podría explicar la ausencia de cambios tan sutiles en este tipo de modelos.

En diversos modelos se ha demostrado el efecto de la programación nutricional por dieta cafetería y *western* en el desarrollo de un perfil proinflamatorio periférico y

cerebral similar a como sucede en modelos expuestos a la MIA (Bordeleau et al. 2020; de Paula et al. 2021; Hameete et al. 2021; Maldonado-Ruiz et al. 2021). Los estudios concuerdan con el hecho de que los modelos de MIA son ineficientes para activar de manera importante a la microglia y causar efectos sinápticos lo suficientemente notables como aquellos que acontecen en los humanos que son diagnosticados con el TEA. Aunque aún en investigación, se piensa que la MIA altera de forma considerable al sistema inmunológico de la descendencia y predispone al cerebro e individuo a ser más sensible a estímulos posteriores al nacimiento (Chen et al. 2020). En este contexto, los investigadores sugieren que se requiere de un segundo estímulo o “*second hit*” para consolidar el fenotipo aberrante en la descendencia en etapas tempranas de la vida. Evidencia reciente confirma que eventos inflamatorios crónicos de bajo grado como los que suceden durante el consumo de dietas *western* no promueven de manera relevante la infiltración de células inmunes en la descendencia (Christ et al. 2019), siendo necesario un estímulo secundario o un estímulo inmunológico mucho más pronunciado durante la etapa gestacional.

Por último, es valioso mencionar que los efectos asociados a dietas *western* e incluso dietas altas en grasa puede alterar una gran diversidad de factores sobre la descendencia, desde alteraciones en el microbioma (Buffington et al. 2016), genes, proteínas, perfiles de metilación (Gawlińska et al. 2021) y disfunción neuronal (Bordeleau et al. 2020), hasta cambios epigenéticos en el entorno feto-placentario de la madre (Gastiazoro et al. 2022). Esto nos induce a pensar que en la realidad el humano está expuesto a múltiples estímulos posteriores al nacimiento, por lo que nuestro proyecto y la evidencia documentada enfatiza que la interacción de gen-ambiente podría modular negativa o positivamente desenlaces conductuales durante el envejecimiento fisiológico.

## **9. CONCLUSIONES**

La programación nutricional por dieta cafetería favorece el desarrollo de conductas estereotípicas y defectos en la sociabilidad en la descendencia de madres alimentadas con dieta cafetería. De acuerdo a nuestro estudio, no se presenta infiltración de células inmunes ni activación de la microglia en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado de la descendencia, las cuales representan regiones cerebrales relacionadas con el desarrollo del TEA.

## 10. PERSPECTIVAS

La utilización de un modelo de *double-hit* podría evidenciar de mejor manera los efectos perjudiciales de la activación inmune materna y la programación nutricional materna tras la adquisición de un segundo estímulo nocivo sobre la descendencia predispuesta, simulando de mejor manera lo que sucede en trastornos como el TEA.

La utilización de técnicas como la microscopía de fluorescencia o la inmunohistoquímica podrían ayudarnos a ver, de manera más concreta, cambios en los fenotipos e infiltración cuando no son tan evidentes en cuestión de número de células, además de observarlos directamente localizados en regiones de interés.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, K. N., Arnott, C. K., Westbrook, R. F., & Tran, D. M. D. (2019). The effect of high fat, high sugar, and combined high fat-high sugar diets on spatial learning and memory in rodents: A meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 107, 399–421.
- Angoa-Pérez, M., Kane, M. J., Briggs, D. I., Francescutti, D. M., & Kuhn, D. M. (2013). Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 82(82), 50978.
- Ashwood, P., Corbett, B. A., Kantor, A., Schulman, H., Van de Water, J., & Amaral, D. G. (2011). In Search of Cellular Immunophenotypes in the Blood of Children with Autism. *PLoS ONE*, 6(5), e19299.
- Asociación Americana de Psiquiatría. (2014). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* (5th ed.). Asociación Americana de Psiquiatría.
- Bacchelli, E., Cameli, C., Viggiano, M., Igliazzi, R., Mancini, A., Tancredi, R., Battaglia, A., & Maestrini, E. (2020). An integrated analysis of rare CNV and exome variation in Autism Spectrum Disorder using the Infinium PsychArray. *Scientific Reports*, 10(1), 3198.
- Balsevich, G., Baumann, V., Uribe, A., Chen, A., & Schmidt, M. V. (2016). Prenatal Exposure to Maternal Obesity Alters Anxiety and Stress Coping Behaviors in Aged Mice. *Neuroendocrinology*, 103(3–4), 354–368.
- Barbera, G., Liang, B., Zhang, Y., Moffitt, C., Li, Y., & Lin, D.-T. (2020). An open-source capacitive touch sensing device for three chamber social behavior test. *MethodsX*, 7, 101024.
- Bilbo, S. D., Block, C. L., Bolton, J. L., Hanamsagar, R., & Tran, P. K. (2018). Beyond infection - Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Experimental Neurology*, 299(Pt A), 241–251.
- Bilbo, S. D., & Schwarz, J. M. (2012). The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(3), 267–286.
- Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain

- inflammation and behavior of offspring. *The FASEB Journal*, 24(6), 2104–2115.
- Bölte, S., Girdler, S., & Marschik, P. B. (2019). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(7), 1275–1297.
- Bolton, J. L., Auten, R. L., & Bilbo, S. D. (2014). Prenatal air pollution exposure induces sexually dimorphic fetal programming of metabolic and neuroinflammatory outcomes in adult offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 30–44.
- Bordeleau, M., Fernández de Cossío, L., Chakravarty, M. M., & Tremblay, M.-È. (2021). From Maternal Diet to Neurodevelopmental Disorders: A Story of Neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 612705.
- Bordeleau, M., Lacabanne, C., Fernández de Cossío, L., Vernoux, N., Savage, J. C., González-Ibáñez, F., & Tremblay, M.-È. (2020). Microglial and peripheral immune priming is partially sexually dimorphic in adolescent mouse offspring exposed to maternal high-fat diet. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 264.
- Breece, E., Paciotti, B., Nordahl, C. W., Ozonoff, S., Van de Water, J. A., Rogers, S. J., Amaral, D., & Ashwood, P. (2013). Myeloid dendritic cells frequencies are increased in children with autism spectrum disorder and associated with amygdala volume and repetitive behaviors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 69–75.
- Bressler, J. P., Gillin, P. K., O’Driscoll, C., Kiihl, S., Solomon, M., & Zimmerman, A. W. (2012). Maternal Antibody Reactivity to Lymphocytes of Offspring With Autism. *Pediatric Neurology*, 47(5), 337–340.
- Buckman, L. B., Hasty, A. H., Flaherty, D. K., Buckman, C. T., Thompson, M. M., Matlock, B. K., Weller, K., & Ellacott, K. L. J. (2014). Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35, 33–42.
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, 165(7), 1762–1775.
- Butler, M. J., Cole, R. M., Deems, N. P., Belury, M. A., & Barrientos, R. M. (2020). Fatty food, fatty acids, and microglial priming in the adult and aged hippocampus and amygdala. *Brain, Behavior, and Immunity*, 89, 145–158.

- Cai, Y., Wang, L., Nalvarte, I., Xiao, R., Li, X., & Fan, X. (2019). Citalopram attenuates social behavior deficits in the BTBR T+Itr3tf/J mouse model of autism. *Brain Research Bulletin*, 150, 75–85.
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2011). Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2), 226–238.
- Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., de la Garza, A. L., Torre-Villalvazo, I., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Corona-Castillo, J. C., Tovar, A. R., Zambrano, E., Ortiz-Lopez, R., Saville, J., Fuller, M., & Camacho, A. (2018). Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutrition & Metabolism*, 15(1), 38.
- Cataldo, I., Azhari, A., & Esposito, G. (2018). A Review of Oxytocin and Arginine-Vasopressin Receptors and Their Modulation of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 27.
- Cattane, N., Richetto, J., & Cattaneo, A. (2020). Prenatal exposure to environmental insults and enhanced risk of developing Schizophrenia and Autism Spectrum Disorder: focus on biological pathways and epigenetic mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 117, 253–278.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder. September 2020. <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>
- Chang, Y.-C., Li, W.-Y., Lee, L. J.-H., & Lee, L.-J. (2020). Interplay of Prenatal and Postnatal Risk Factors in the Behavioral and Histological Features of a “Two-Hit” Non-Genetic Mouse Model of Schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8518.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3–S23.
- Cheeran, M. C. J., Lokensgard, J. R., & Schleiss, M. R. (2009). Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 99–126.
- Chen, H.-R., Chen, C.-W., Kuo, Y.-M., Chen, B., Kuan, I. S., Huang, H., Lee, J., Anthony,

- N., Kuan, C.-Y., & Sun, Y.-Y. (2022). Monocytes promote acute neuroinflammation and become pathological microglia in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Theranostics*, 12(2), 512–529.
- Chen, H.-R., Chen, C.-W., Mandhani, N., Short-Miller, J. C., Smucker, M. R., Sun, Y.-Y., & Kuan, C.-Y. (2020). Monocytic Infiltrates Contribute to Autistic-like Behaviors in a Two-Hit Model of Neurodevelopmental Defects. *The Journal of Neuroscience*, 40(49), 9386–9400.
- Chess, S. (1977). Follow-up report on autism in congenital rubella. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, 7(1), 69–81.
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., & Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276), 933–939.
- Christ, A., Günther, P., Lauterbach, M. A. R., Duewell, P., Biswas, D., Pelka, K., Scholz, C. J., Oosting, M., Haendler, K., Baßler, K., Klee, K., Schulte-Schrepping, J., Ulas, T., Moorlag, S. J. C. F. M., Kumar, V., Park, M. H., Joosten, L. A. B., Groh, L. A., Riksen, N. P., ... Latz, E. (2018). Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell*, 172(1–2), 162-175.e14.
- Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794–811.
- Cowan, M., & Petri, W. A. (2018). Microglia: Immune Regulators of Neurodevelopment. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 2576.
- Cruz-Carrillo, G., & Camacho-Morales, A. (2020). Metabolic Flexibility Assists Reprogramming of Central and Peripheral Innate Immunity During Neurodevelopment. *Molecular Neurobiology*.
- 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(452).
- Cui, J., Shipley, F. B., Shannon, M. L., Alturkistani, O., Dani, N., Webb, M. D., Sugden, A. U., Andermann, M. L., & Lehtinen, M. K. (2020). Inflammation of the Embryonic

- Choroid Plexus Barrier following Maternal Immune Activation. *Developmental Cell*, 55(5), 617-628.e6.
- De Crescenzo, F., D'Alò, G. L., Morgano, G. P., Minozzi, S., Mitrova, Z., Saulle, R., Cruciani, F., Fulceri, F., Davoli, M., Scattoni, M. L., Nardocci, F., Schünemann, H. J., & Amato, L. (2020). Impact of polyunsaturated fatty acids on patient-important outcomes in children and adolescents with autism spectrum disorder: a systematic review. *Health and Quality of Life Outcomes*, 18(1), 28.
- de Paula, G. C., Brunetta, H. S., Engel, D. F., Gaspar, J. M., Velloso, L. A., Engblom, D., de Oliveira, J., & de Bem, A. F. (2021). Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood-Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 734158.
- Demeestere, D., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2015). Clinical implications of leukocyte infiltration at the choroid plexus in (neuro)inflammatory disorders. *Drug Discovery Today*, 20(8), 928–941.
- Dhaliwal, K. K., Orsso, C. E., Richard, C., Haqq, A. M., & Zwaigenbaum, L. (2019). Risk Factors for Unhealthy Weight Gain and Obesity among Children with Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3285.
- DiStasio, M. M., Nagakura, I., Nadler, M. J., & Anderson, M. P. (2019). T lymphocytes and cytotoxic astrocyte blebs correlate across autism brains. *Annals of Neurology*, 86(6), 885–898.
- Duffney, L. J., Valdez, P., Tremblay, M. W., Cao, X., Montgomery, S., McConkie-Rosell, A., & Jiang, Y. (2018). Epigenetics and autism spectrum disorder: A report of an autism case with mutation in H1 linker histone HIST1H1E and literature review. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 177(4), 426–433.
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353(6301), 772–777.
- Felger, J. C., Abe, T., Kaunzner, U. W., Gottfried-Blackmore, A., Gal-Toth, J., McEwen, B. S., Iadecola, C., & Bulloch, K. (2010). Brain dendritic cells in ischemic stroke: Time course, activation state, and origin. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(5), 724–737.

- Fernandes, C., Grayton, H., Poston, L., Samuelsson, A.-M., Taylor, P. D., Collier, D. A., & Rodriguez, A. (2012). Prenatal exposure to maternal obesity leads to hyperactivity in offspring. *Molecular Psychiatry*, 17(12), 1159–1160.
- Firmal, P., Shah, V. K., & Chattopadhyay, S. (2020). Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. *Frontiers in Immunology*, 11, 807.
- Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., & Nealy, B. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669–1685.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446–450.
- Gastiazoro, M., Rossetti, M., Schumacher, R., Stoker, C., Durando, M., Zierau, O., Ramos, J., & Varayoud, J. (2022). Epigenetic disruption of placental genes by chronic maternal cafeteria diet in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 109015.
- Gawlińska, K., Gawliński, D., Kowal-Wiśniewska, E., Jarmuż-Szymczak, M., & Filip, M. (2021). Alteration of the Early Development Environment by Maternal Diet and the Occurrence of Autistic-like Phenotypes in Rat Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9662.
- Gogoleva, V. S., Drutskaya, M. S., & Atretkhany, K. S. N. (2019). The Role of Microglia in the Homeostasis of the Central Nervous System and Neuroinflammation. *Molecular Biology*, 53(5), 696–703.
- Goines, P. E., & Ashwood, P. (2013). Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 67–81.
- Goodwin, L. R., & Picketts, D. J. (2018). The role of ISWI chromatin remodeling complexes in brain development and neurodevelopmental disorders. *Molecular and*

Cellular Neuroscience, 87, 55–64.

- Grayson, B. E., Levasseur, P. R., Williams, S. M., Smith, M. S., Marks, D. L., & Grove, K. L. (2010). Changes in Melanocortin Expression and Inflammatory Pathways in Fetal Offspring of Nonhuman Primates Fed a High-Fat Diet. *Endocrinology*, 151(4), 1622–1632.
- Greene, R. K., Walsh, E., Mosner, M. G., & Dichter, G. S. (2019). A potential mechanistic role for neuroinflammation in reward processing impairments in autism spectrum disorder. *Biological Psychology*, 142, 1–12.
- Guerini, F. R., Bolognesi, E., Chiappedi, M., Manca, S., Ghezzi, A., Agliardi, C., Zanette, M., Littera, R., Carcassi, C., Sotgiu, S., & Clerici, M. (2014). Activating KIR molecules and their cognate ligands prevail in children with a diagnosis of ASD and in their mothers. *Brain, Behavior, and Immunity*, 36, 54–60.
- Guerrin, C. G. J., Doorduyn, J., Sommer, I. E., & de Vries, E. F. J. (2021). The dual hit hypothesis of schizophrenia: Evidence from animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 1150–1168.
- Hameete, B. C., Fernández-Calleja, J. M. S., de Groot, M. W. G. D. M., Oppewal, T. R., Tiemessen, M. M., Hogenkamp, A., de Vries, R. B. M., & Groenink, L. (2021). The poly(I:C)-induced maternal immune activation model; a systematic review and meta-analysis of cytokine levels in the offspring. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 11, 100192.
- Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., Nielsen, T. C., Mohammad, S. S., Hofer, M. J., Gold, W., Brilot, F., Lain, S. J., Nassar, N., & Dale, R. C. (2021). Maternal acute and chronic inflammation in pregnancy is associated with common neurodevelopmental disorders: a systematic review. *Translational Psychiatry*, 11(1), 71.
- He, H., Geng, T., Chen, P., Wang, M., Hu, J., Kang, L., Song, W., & Tang, H. (2016). NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. *Scientific Reports*, 6(1), 27711.
- Hickman, S. E., & El Khoury, J. (2019). Analysis of the Microglial Sensome. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2034, pp. 305–323). Humana Press Inc.
- Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2018). Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood–brain barrier. *Fluids*

- and Barriers of the CNS, 15(1), 30.
- Howe, A.-M., Burke, S., O'Reilly, M. E., McGillicuddy, F. C., & Costello, D. A. (2022). Palmitic Acid and Oleic Acid Differently Modulate TLR2-Mediated Inflammatory Responses in Microglia and Macrophages. *Molecular Neurobiology*, 59(4), 2348–2362.
- Hoye, M. L., Archambault, A. S., Gordon, T. M., Oetjen, L. K., Cain, M. D., Klein, R. S., Crosby, S. D., Kim, B. S., Miller, T. M., & Wu, G. F. (2018). MicroRNA signature of central nervous system-infiltrating dendritic cells in an animal model of multiple sclerosis. *Immunology*, 155(1), 112–122.
- Jiang, N. M., Cowan, M., Moonah, S. N., & Petri, W. A. (2018). The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. *Trends in Molecular Medicine*, 24(9), 794–804.
- Johnston, G. R., & Webster, N. R. (2009). Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *British Journal of Anaesthesia*, 102(4), 453–462.
- Jones, K. L., Croen, L. A., Yoshida, C. K., Heuer, L., Hansen, R., Zerbo, O., DeLorenze, G. N., Kharrazi, M., Yolken, R., Ashwood, P., & Van de Water, J. (2017). Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Molecular Psychiatry*, 22(2), 273–279.
- Keleher, M. R., Zaidi, R., Shah, S., Oakley, M. E., Pavlatos, C., El Idrissi, S., Xing, X., Li, D., Wang, T., & Cheverud, J. M. (2018). Maternal high-fat diet associated with altered gene expression, DNA methylation, and obesity risk in mouse offspring. *PLOS ONE*, 13(2), e0192606.
- Kellie, S., & Al-Mansour, Z. (2017). Overview of the Immune System. In *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development* (pp. 63–81). Elsevier.
- Kiecolt-Glaser, J. K. (2010). Stress, Food, and Inflammation: Psychoneuroimmunology and Nutrition at the Cutting Edge. *Psychosomatic Medicine*, 72(4), 365–369.
- Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., Toovey, S., & Prinssen, E. P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 643–660.
- Kreitz, S., Zambon, A., Ronovsky, M., Budinsky, L., Helbich, T. H., Sideromenos, S.,



- Ivan, C., Konerth, L., Wank, I., Berger, A., Pollak, A., Hess, A., & Pollak, D. D. (2020). Maternal immune activation during pregnancy impacts on brain structure and function in the adult offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 83, 56–67.
- Lainez, N. M., Jonak, C. R., Nair, M. G., Ethell, I. M., Wilson, E. H., Carson, M. J., & Coss, D. (2018). Diet-Induced Obesity Elicits Macrophage Infiltration and Reduction in Spine Density in the Hypothalamus of Male but Not Female Mice. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 1992.
- Lancaster, G. I., Langley, K. G., Berglund, N. A., Kammoun, H. L., Reibe, S., Estevez, E., Weir, J., Mellett, N. A., Pernes, G., Conway, J. R. W., Lee, M. K. S., Timpson, P., Murphy, A. J., Masters, S. L., Gerondakis, S., Bartonicek, N., Kaczorowski, D. C., Dinger, M. E., Meikle, P. J., ... Febbraio, M. A. (2018). Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metabolism*, 27(5), 1096-1110.e5.
- Lee, P. M. Y., Tse, L. A., László, K. D., Wei, D., Yu, Y., & Li, J. (2021). Association of maternal body mass index with intellectual disability risk. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 106(6), 584–590.
- Leyrolle, Q., Decoeur, F., Briere, G., Amadiou, C., Quadros, A. R. A. A., Voytyuk, I., Lacabanne, C., Benmamar-Badel, A., Bourel, J., Aubert, A., Sere, A., Chain, F., Schwendimann, L., Matrot, B., Bourgeois, T., Grégoire, S., Leblanc, J. G., De Moreno De Leblanc, A., Langella, P., ... Nadjar, A. (2021). Maternal dietary omega-3 deficiency worsens the deleterious effects of prenatal inflammation on the gut-brain axis in the offspring across lifetime. *Neuropsychopharmacology*, 46(3), 579–602.
- Li, L., Lagerberg, T., Chang, Z., Cortese, S., Rosenqvist, M. A., Almqvist, C., D’Onofrio, B. M., Hegvik, T.-A., Hartman, C., Chen, Q., & Larsson, H. (2020). Maternal pre-pregnancy overweight/obesity and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: a systematic review, meta-analysis and quasi-experimental family-based study. *International Journal of Epidemiology*, 49(3), 857–875.
- Li, T., & Zhang, S. (2016). Microgliosis in the Injured Brain. *The Neuroscientist*, 22(2), 165–170.
- Li, Y.-G., Siripanyaphinyo, U., Tumkosit, U., Noranate, N., A-nuegoonpipat, A., Pan, Y.,

- Kameoka, M., Kurosu, T., Ikuta, K., Takeda, N., & Anantapreecha, S. (2012). Poly (I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. *Virology Journal*, 9(1), 114.
- Liang, Z., Han, L., Sun, D., Chen, Y., Wu, Q., Zhang, L., Zhou, M., & Chen, D. (2019). Chemerin-induced macrophages pyroptosis in fetal brain tissue leads to cognitive disorder in offspring of diabetic dams. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 226.
- Louveau, A., Plog, B. A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., & Kipnis, J. (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3210–3219.
- Lu, Z., Liu, Z., Mao, W., Wang, X., Zheng, X., Chen, S., Cao, B., Huang, S., Zhang, X., Zhou, T., Zhang, Y., Huang, X., Sun, Q., & Li, J.-D. (2020). Locus-specific DNA methylation of *Mecp2* promoter leads to autism-like phenotypes in mice. *Cell Death & Disease*, 11(2), 85.
- Lurie, D. I. (2018). An Integrative Approach to Neuroinflammation in Psychiatric disorders and Neuropathic Pain. *Journal of Experimental Neuroscience*, 12, 117906951879363.
- Maenner, M. J., Shaw, K. A., Baio, J., Washington, A., Patrick, M., DiRienzo, M., Christensen, D. L., Wiggins, L. D., Pettygrove, S., Andrews, J. G., Lopez, M., Hudson, A., Baroud, T., Schwenk, Y., White, T., Rosenberg, C. R., Lee, L.-C., Harrington, R. A., Huston, M., ... Dietz, P. M. (2020). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR. Surveillance Summaries*, 69(4), 1–12.
- Maldonado-Ruiz, R., Cárdenas-Tueme, M., Montalvo-Martínez, L., Vidaltamayo, R., Garza-Ocañas, L., Reséndez-Perez, D., & Camacho, A. (2019a). Priming of Hypothalamic Ghrelin Signaling and Microglia Activation Exacerbate Feeding in Rats' Offspring Following Maternal Overnutrition. *Nutrients*, 11(6), 1241.
- Maldonado-Ruiz, R., Garza-Ocañas, L., & Camacho, A. (2019b). Inflammatory domains modulate autism spectrum disorder susceptibility during maternal nutritional programming. *Neurochemistry International*, 126, 109–117.
- Maldonado-Ruiz, R., Montalvo-Martínez, L., Fuentes-Mera, L., & Camacho, A. (2017).

- Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes. *Nutrition & Diabetes*, 7(3), e254–e254.
- 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. (2021). MCP-1 Signaling Disrupts Social Behavior by Modulating Brain Volumetric Changes and Microglia Morphology. *Molecular Neurobiology*.
- Marciniak, A., Patro-Małyśza, J., Kimber-Trojnar, Ż., Marciniak, B., Oleszczuk, J., & Leszczyńska-Gorzela, B. (2017). Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(2), 133–138.
- Marrone, M. C., & Coccorello, R. (2019). Dietary Fatty Acids and Microbiota-Brain Communication in Neuropsychiatric Diseases. *Biomolecules*, 10(1), 12.
- Masi, A., Glozier, N., Dale, R., & Guastella, A. J. (2017). The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience Bulletin*, 33(2), 194–204.
- Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., & Crack, P. J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 75–90.
- Mawson, A. R., & Croft, A. M. (2019). Rubella Virus Infection, the Congenital Rubella Syndrome, and the Link to Autism. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(19), 3543.
- Meltzer, A., & Van de Water, J. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284–298.
- Meyer, U. (2014). Prenatal Poly(I:C) Exposure and Other Developmental Immune Activation Models in Rodent Systems. *Biological Psychiatry*, 75(4), 307–315.
- Minakova, E., & Warner, B. B. (2018). Maternal immune activation, central nervous system development and behavioral phenotypes. *Birth Defects Research*, 110(20), 1539–1550.
- Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, 8(1), 13.

- Moreno-Fernandez, J., Ochoa, J. J., Lopez-Frias, M., & Diaz-Castro, J. (2020). Impact of Early Nutrition, Physical Activity and Sleep on the Fetal Programming of Disease in the Pregnancy: A Narrative Review. *Nutrients*, 12(12), 3900.
- Moy, S. S., Riddick, N. V., Nikolova, V. D., Teng, B. L., Agster, K. L., Nonneman, R. J., Young, N. B., Baker, L. K., Nadler, J. J., & Bodfish, J. W. (2014). Repetitive behavior profile and supersensitivity to amphetamine in the C58/J mouse model of autism. *Behavioural Brain Research*, 259, 200–214.
- National Institute of Mental Health (NIMH). (2020). Autism Spectrum Disorder (ASD). April 2020. <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/autism-spectrum-disorder-asd.shtml>
- Nisar, S., Hashem, S., Bhat, A. A., Syed, N., Yadav, S., Azeem, M. W., Uddin, S., Bagga, P., Reddy, R., & Haris, M. (2019). Association of genes with phenotype in autism spectrum disorder. *Aging*, 11(22), 10742–10770.
- Novak, C. M., Lee, J. Y., Ozen, M., Tsimis, M. E., Kucirka, L. M., McLane, M. W., Xie, L., Kelleher, M., Xie, H., Jia, B., Lei, J., & Burd, I. (2019). Increased placental T cell trafficking results in adverse neurobehavioral outcomes in offspring exposed to sub-chronic maternal inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 75, 129–136.
- Nuttall, J. R. (2017). The plausibility of maternal toxicant exposure and nutritional status as contributing factors to the risk of autism spectrum disorders. *Nutritional Neuroscience*, 20(4), 209–218.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173(4), 649–665.
- Ormstad, H., Bryn, V., Saugstad, O. D., Skjeldal, O., & Maes, M. (2018). Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorders (ASD). *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17(7), 489–495.
- Ortiz, G. G., Pacheco-Moisés, F. P., Macías-Islas, M. Á., Flores-Alvarado, L. J., Mireles-Ramírez, M. A., González-Renovato, E. D., Hernández-Navarro, V. E., Sánchez-López, A. L., & Alatorre-Jiménez, M. A. (2014). Role of the Blood–Brain Barrier in Multiple Sclerosis. *Archives of Medical Research*, 45(8), 687–697.
- Oz, H. (2017). Nutrients, Infectious and Inflammatory Diseases. *Nutrients*, 9(10), 1085.
- Ozaki, K., Kato, D., Ikegami, A., Hashimoto, A., Sugio, S., Guo, Z., Shibushita, M.,

- Tatematsu, T., Haruwaka, K., Moorhouse, A. J., Yamada, H., & Wake, H. (2020). Maternal immune activation induces sustained changes in fetal microglia motility. *Scientific Reports*, 10(1), 21378.
- Parisi, F., Milazzo, R., Savasi, V. M., & Cetin, I. (2021). Maternal Low-Grade Chronic Inflammation and Intrauterine Programming of Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1732.
- Praetorius, J., & Damkier, H. H. (2017). Transport across the choroid plexus epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(6), C673–C686.
- Prata, J., Machado, A. S., von Doellinger, O., Almeida, M. I., Barbosa, M. A., Coelho, R., & Santos, S. G. (2019). The Contribution of Inflammation to Autism Spectrum Disorders: Recent Clinical Evidence. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2011, pp. 493–510). Humana Press Inc.
- Prinz, M., & Priller, J. (2017). The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nature Neuroscience*, 20(2), 136–144.
- Qiu, T., Guo, B.-B., Wang, L.-Z., Zhang, H., Xu, Y., & Jiang, X.-Y. (2018). Association between overweight/obesity in parents and autism spectrum disorders in offspring. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 20(5), 383–386.
- Qiu, Y., Zhang, C., Chen, A., Wang, H., Zhou, Y., Li, Y., & Hu, B. (2021). Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy? *Frontiers in Immunology*, 12.
- Raggi, F., Cangelosi, D., Becherini, P., Blengio, F., Morini, M., Acquaviva, M., Belli, M. L., Panizzon, G., Cervo, G., Varesio, L., Eva, A., & Bosco, M. C. (2020). Transcriptome analysis defines myocardium gene signatures in children with ToF and ASD and reveals disease-specific molecular reprogramming in response to surgery with cardiopulmonary bypass. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 21.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991.
- Rauschenberger, L., Knorr, S., Pisani, A., Hallett, M., Volkmann, J., & Ip, C. W. (2021). Second hit hypothesis in dystonia: Dysfunctional cross talk between neuroplasticity and environment? *Neurobiology of Disease*, 159, 105511.
- 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 & Therapeutics*, 149, 213–226.
- Reynolds, L. C., Inder, T. E., Neil, J. J., Pineda, R. G., & Rogers, C. E. (2014). Maternal obesity and increased risk for autism and developmental delay among very preterm infants. *Journal of Perinatology*, 34(9), 688–692.
- Ricci, S., Businaro, R., Ippoliti, F., Lo Vasco, V. R., Massoni, F., Onofri, E., Troili, G. M., Pontecorvi, V., Morelli, M., Rapp Ricciardi, M., & Archer, T. (2013). Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. *Neurotoxicity Research*, 24(4), 491–501.
- Rodriguez, A. (2010). Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 51(2), 134–143.
- Rogero, M., & Calder, P. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, 10(4), 432.
- Rua, R., & McGavern, D. B. (2018). Advances in Meningeal Immunity. *Trends in Molecular Medicine*, 24(6), 542–559.
- Rylaarsdam, L., & Guemez-Gamboa, A. (2019). Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13.
- Saad, K., Zahran, A. M., Elsayh, K. I., Abdel-Rahman, A. A., Al-Atram, A. A., Hussein, A., & El-Gendy, Y. G. (2017). Frequency of Dendritic Cells and Their Expression of Costimulatory Molecules in Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 47(9), 2671–2678.
- Saghazadeh, A., Ataenia, B., Keynejad, K., Abdolalizadeh, A., Hirbod-Mobarakeh, A., & Rezaei, N. (2019). Anti-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*, 123, 154740.
- Sanders, S. J., Ercan-Sencicek, A. G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M. T., Moreno-De-Luca, D., Chu, S. H., Moreau, M. P., Gupta, A. R., Thomson, S. A., Mason, C. E., Bilguvar, K., Celestino-Soper, P. B. S., Choi, M., Crawford, E. L., Davis, L., Davis Wright, N. R., Dhodapkar, R. M., DiCola, M., ... State, M. W. (2011). Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron*, 70(5), 863–885.

- Santana-Santana, M., Bayascas, J.-R., & Giménez-Llort, L. (2021). Sex-Dependent Signatures, Time Frames and Longitudinal Fine-Tuning of the Marble Burying Test in Normal and AD-Pathological Aging Mice. *Biomedicines*, 9(8), 994.
- Sasaki, A., de Vega, W., Sivanathan, S., St-Cyr, S., & McGowan, P. O. (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience*, 272, 92–101.
- Sasaki, T., Tome, S., & Takei, Y. (2020). Intraventricular IL-17A administration activates microglia and alters their localization in the mouse embryo cerebral cortex. *Molecular Brain*, 13(1), 93.
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring. *The Journal of Neuroscience*, 23(1), 297–302.
- Shukla, S., & Maraqa, N. F. (2020). Congenital Rubella. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939656>
- Siniscalco, D., Schultz, S., Brigida, A., & Antonucci, N. (2018). Inflammation and Neuro-Immune Dysregulations in Autism Spectrum Disorders. *Pharmaceuticals*, 11(2), 56.
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *Journal of Neuroscience*, 27(40), 10695–10702.
- Spain, D., Zivralı Yarar, E., & Happé, F. (2020). Social anxiety in adults with autism: a qualitative study. *International Journal of Qualitative Studies on Health and Well-Being*, 15(1), 1803669.
- Sullivan, E. L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Bethea, C. L., Smith, M. S., Coleman, K., & Grove, K. L. (2010). Chronic Consumption of a High-Fat Diet during Pregnancy Causes Perturbations in the Serotonergic System and Increased Anxiety-Like Behavior in Nonhuman Primate Offspring. *Journal of Neuroscience*, 30(10), 3826–3830.
- Sullivan, E. L., Riper, K. M., Lockard, R., & Valteau, J. C. (2015). Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. *Hormones and Behavior*, 76, 153–161.
- Sun, W., Poschmann, J., Cruz-Herrera del Rosario, R., Parikshak, N. N., Hajan, H. S.,

- Kumar, V., Ramasamy, R., Belgard, T. G., Elanggovan, B., Wong, C. C. Y., Mill, J., Geschwind, D. H., & Prabhakar, S. (2016). Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell*, 167(5), 1385-1397.e11.
- Suzuki, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Kamenno, Y., Shimmura, C., Kawai, S., Yoshihara, Y., Wakuda, T., Takebayashi, K., Takagai, S., Matsumoto, K., Tsuchiya, K. J., Iwata, Y., Nakamura, K., Tsujii, M., Sugiyama, T., & Mori, N. (2011). Plasma Cytokine Profiles in Subjects with High-Functioning Autism Spectrum Disorders. *PLoS ONE*, 6(5), e20470.
- Takata, F., Nakagawa, S., Matsumoto, J., & Dohgu, S. (2021). Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 344.
- Tanabe, S., & Yamashita, T. (2019). B lymphocytes: Crucial contributors to brain development and neurological diseases. *Neuroscience Research*, 139, 37–41.
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K., & Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 124(1–2), 83–92.
- Tremblay, M. W., & Jiang, Y. (2019). DNA Methylation and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. *Annual Review of Medicine*, 70(1), 151–166.
- 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.
- Vallièrès, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., & Sawchenko, P. E. (2002). Reduced Hippocampal Neurogenesis in Adult Transgenic Mice with Chronic Astrocytic Production of Interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, 22(2), 486–492.
- Wang, T., Guo, H., Xiong, B., Stessman, H. A. F., Wu, H., Coe, B. P., Turner, T. N., Liu, Y., Zhao, W., Hoekzema, K., Vives, L., Xia, L., Tang, M., Ou, J., Chen, B., Shen, Y., Xun, G., Long, M., Lin, J., ... Eichler, E. E. (2016). De novo genic mutations among a Chinese autism spectrum disorder cohort. *Nature Communications*, 7(1),



13316.

- Waye, M. M. Y., & Cheng, H. Y. (2018). Genetics and epigenetics of autism: A Review. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72(4), 228–244.
- Weiser, M. J., Mucha, B., Denheyer, H., Atkinson, D., Schanz, N., Vassiliou, E., & Benno, R. H. (2016). Dietary docosahexaenoic acid alleviates autistic-like behaviors resulting from maternal immune activation in mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 106, 27–37.
- Więckowska-Gacek, A., Mietelska-Porowska, A., Wydrych, M., & Wojda, U. (2021). Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 70, 101397.
- Winther, G., Elfving, B., Müller, H. K., Lund, S., & Wegener, G. (2018). Maternal High-fat Diet Programs Offspring Emotional Behavior in Adulthood. *Neuroscience*, 388, 87–101.
- Wong, C. T., Bestard-Lorigados, I., & Crawford, D. A. (2019). Autism-related behaviors in the cyclooxygenase-2-deficient mouse model. *Genes, Brain and Behavior*, 18(1), e12506.
- Wong, H., & Hoeffler, C. (2018). Maternal IL-17A in autism. *Experimental Neurology*, 299, 228–240.
- Woodburn, S. C., Bollinger, J. L., & Wohleb, E. S. (2021). The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 258.
- Wu, W.-L., Hsiao, E. Y., Yan, Z., Mazmanian, S. K., & Patterson, P. H. (2017). The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 11–23.
- Xiao, L., Yan, J., Feng, D., Ye, S., Yang, T., Wei, H., Li, T., Sun, W., & Chen, J. (2021). Critical Role of TLR4 on the Microglia Activation Induced by Maternal LPS Exposure Leading to ASD-Like Behavior of Offspring. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 634837.
- Xu, J., Marshall, J. J., Kraniotis, S., Nomura, T., Zhu, Y., & Contractor, A. (2021). Genetic disruption of *Grm5* causes complex alterations in motor activity, anxiety and social

- behaviors. *Behavioural Brain Research*, 411, 113378.
- Yang, X., Haghiac, M., Glazebrook, P., Minium, J., Catalano, P. M., & Hauguel-de Mouzon, S. (2015). Saturated fatty acids enhance TLR4 immune pathways in human trophoblasts. *Human Reproduction*, 30(9), 2152–2159.
- Yarlagadda, A., Alfson, E., & Clayton, A. H. (2009). The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry. *Psychiatry (Edgmont (Pa. : Township))*, 6(11), 18–22.
- Yockey, L. J., & Iwasaki, A. (2018). Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity*, 49(3), 397–412.