

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**LA SUPLEMENTACIÓN CON DONADORES DE METILO Y SU EFECTO
REGULADOR SOBRE EL DESARROLLO DE CONDUCTA SIMILAR AL
AUTISMO EN LA DESCENDENCIA DE MADRES ALIMENTADAS CON DIETA
DE CAFETERÍA EN UN MODELO MURINO**

POR

L.N KATYA BEATRIZ HERRERA VALDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

DICIEMBRE, 2021

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**LA SUPLEMENTACIÓN CON DONADORES DE METILO Y SU EFECTO
REGULADOR SOBRE EL DESARROLLO DE CONDUCTA SIMILAR AL
AUTISMO EN LA DESCENDENCIA DE MADRES ALIMENTADAS CON DIETA
DE CAFETERÍA EN UN MODELO MURINO**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

PRESENTA

L.N KATYA BEATRIZ HERRERA VALDEZ

MONTERREY, N.L, MÉXICO

DICIEMBRE, 2021

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada “**LA SUPLEMENTACIÓN CON DONADORES DE METILO Y SU EFECTO REGULADOR SOBRE EL DESARROLLO DE CONDUCTA SIMILAR AL AUTISMO EN LA DESCENDENCIA DE MADRES ALIMENTADAS CON DIETA DE CAFETERÍA EN UN MODELO MURINO**” presentada por la L.N. Katya Beatriz Herrera Valdez, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández

Presidente

Dr. Heriberto Castro García

Secretario

Dr. Alberto Camacho Morales

Vocal

Monterrey, Nuevo León a diciembre de 2021

**LA SUPLEMENTACIÓN CON DONADORES DE METILO Y SU EFECTO
REGULADOR SOBRE EL DESARROLLO DE CONDUCTA SIMILAR AL
AUTISMO EN LA DESCENDENCIA DE MADRES ALIMENTADAS CON DIETA
DE CAFETERÍA EN UN MODELO MURINO**

Aprobación de Tesis

Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández

Presidente

Dr. Heriberto Castro García

Secretario

Dr. Alberto Camacho Morales

Vocal

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Pregunta de investigación.....	19
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Obesidad	20
2.1.1 Estadísticas	20
2.1.2 Etiología	21
2.1.3 Fisiopatología	22
2.2 Programación por obesidad materna.....	24
2.2.1 Programación de trastornos neuropsiquiátricos y del neurodesarrollo..	26
2.3 Trastornos del Espectro Autista.....	27
2.3.1 Estadísticas del TEA	27
2.3.2 Mecanismos fisiopatológicos en el TEA	27
2.4 Modelos animales de autismo	29
2.4.1 Modelos genéticos	29
2.4.2 Modelos farmacológicos de programación materna.....	30
2.4.3 Modelos de programación materna por dieta obesogénica.....	31
2.4.4 Modelos epigenéticos.....	32
2.5 Epigenética y el ciclo de un carbono	33
2.6 Análisis fenotípico de comportamiento en modelos de autismo	37
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo general.....	42
5.2 Objetivos específicos	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1 Diseño experimental	43
6.1.1 Ratones hembra madres.....	44
6.2 Dieta experimental	45

6.2.1 Dieta control	45
6.2.2 Dieta cafetería	45
6.2.3 Dieta donadores de metilo	46
6.2.4 Ratones crías macho	47
6.3 Análisis mediante las pruebas de comportamiento.....	48
6.3.1 Prueba de campo abierto	48
6.3.2 Prueba de Enterramiento de canicas	49
6.3.3 Prueba de sociabilidad de 3-cámaras	50
6.5 Tamaño muestral	53
7. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	54
8. PLAN DE ANÁLISIS.....	56
9. RECURSOS.....	57
9.1 Financieros	57
9.2 Humanos	57
10. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	58
11. RESULTADOS	59
11.1 Ratones C57BL/6 hembras madres.....	59
11.1.1 Ganancia de peso	60
11.1.2 Ingesta dietética	61
11.2 Ratones C57BL/6 macho crías	62
11.2.1 Ganancia de peso	62
11.2.2 Ingesta dietética	63
11.2.3 Pruebas de comportamiento	64
11.2.4 Prueba de sociabilidad de 3-cámaras	65
11.2.5 Prueba de campo abierto	69
11.2.6 Prueba de enterramiento de canicas.....	74
12. DISCUSIÓN.....	75
12.1 La dieta de cafetería y la suplementación con donadores de metilo ejercen un efecto sobre el peso y la ingesta	75
12.1.1 Hembras madres.....	75
12.1.2 Machos crías.....	77
12.2 La dieta materna de cafetería genera un déficit social en la descendencia	80

12.3 La suplementación materna con donadores de metilo frente a una dieta de cafetería normaliza la interacción social en la descendencia	83
12.4 La suplementación materna con donadores de metilo promueve un incremento en la ansiedad en la descendencia	86
13. CONCLUSIONES.....	90
14. REFERENCIAS	91

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Complicaciones en el embarazo derivadas de la obesidad.....	24
Tabla 2. Factores asociados a la obesidad materna y el riesgo de trastornos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos en la descendencia.....	26
Tabla 3. Fenotipo y neurobiología de los principales modelos de autismo en líneas genéticas mutantes	30
Tabla 4. Composición típica de diferentes dietas experimentales.....	31
Tabla 5. Modelos de dieta materna obesogénica.....	32
Tabla 6. Características de donadores de metilo	35
Tabla 7. Modelos de dieta suplementada con donadores de metilo.....	37
Tabla 8. Composición calórica de la dieta estándar Rodent Lab Chow 5001	45
Tabla 9. Composición calórica de la dieta cafetería	46
Tabla 10. Composición calórica de la dieta de cafetería suplementada con donadores de metilo.....	46
Tabla 11. Composición calórica de la dieta estándar Rodent Lab Chow 5001 suplementada con donadores de metilo.....	47
Tabla 12. Operacionalización de las variables de estudio.....	54
Tabla 13. Datos basales de peso e ingesta en las madres	59
Tabla 14. Estado nutricional de las madres en el periodo perinatal y lactancia	59
Tabla 15. Eficiencia energética en crías macho	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad mundial. Adaptado de WHO, 2020.	20
Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta mexicana. Adaptado de Hernández et al., 2018.....	21
Figura 3. Mecanismos fisiopatológicos en la obesidad. La liberación de péptidos que regulan el apetito desde el intestino y el cerebro se ve alterada, al igual que las redes del sistema de recompensa. La microbiota disbiótica libera LPS que producen neuroinflamación y lipoproteínas ricas en LPS viajan al tejido adiposo para promover la inflamación. Los adipocitos por su parte se encuentran en estructura de forma de corona produciendo un ambiente proinflamatorio. Adaptado de Iyengar et al., 2016; Sun et al., 2018.	23
Figura 4. La teoría de Barker. Una nutrición pobre o desnutrición y una sobrenutrición materna incrementan el riesgo de obesidad en la descendencia. Adaptado de Martorell et al., 2001.	25
Figura 5. El Ciclo de un Carbono. La vitamina B9, vitamina B12, betaína y colina son algunos de los nutrientes que intervienen en la generación de SAM. Adaptado de Clare et al., 2019.	34
Figura 6. Pruebas de comportamiento relacionadas al TEA en modelos animales. Prueba de campo abierto. Esta prueba consiste en evaluar el comportamiento exploratorio, tipo ansiedad y locomoción (A). Prueba de enterramiento de canicas. Esta prueba consiste en evaluar el comportamiento repetitivo que mide la cantidad de canicas enterradas en una jaula (B). Prueba de sociabilidad de 3-cámaras. Esta prueba consiste en evaluar el comportamiento social. Se realiza en un aparato de acrílico dividido en 3 cámaras donde se colocan estímulos: en una cámara lateral se coloca al objeto inanimado y en otra un ratón extraño, luego se deja al ratón que explore las tres cámaras por 10 minutos (C).....	39
Figura 7. Diagrama de flujo del diseño experimental. Los ratones hembra se dividieron en 4 grupos dependiendo de la dieta: Control, Cafetería, Control + Metilo y Cafetería + Metilo, la cual se les dio desde el período de aclimatación, apareamiento y gestación hasta el período de lactancia o período posnatal. A las crías macho se les alimentó solamente con dieta control y a la semana 8 se les realizó las pruebas de comportamiento.....	43
Figura 8. Gráfica del diseño experimental. La cepa utilizada será la C57BL/6, los ratones fueron divididos aleatoriamente con cuatro tipos de dieta distintos durante la etapa prenatal (6 semanas) y posnatal (3 semanas). Al finalizar el período de lactancia, las crías fueron destetadas y las madres se sacrificaron.	45

Figura 9. Gráfica del diseño experimental. Al finalizar el período de lactancia, las crías macho fueron destetadas, luego continuaron con dieta control por 7 semanas y posteriormente se realizó el sacrificio..... 48

Figura 10. Peso corporal de las madres. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. b $p < 0.05$ (CT vs CAF); c $p < 0.05$ (CT vs CT + M); d $p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = \geq 3$ /grupo..... 60

Figura 14. Curva de ingesta dietética durante toda la vida en madres. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. b $p < 0.05$ (CT vs CAF); c $p < 0.05$ (CT vs CT + M); d $p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = \geq 3$ /grupo. 61

Figura 15. Peso corporal de las crías macho. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. b $p < 0.05$ (CT vs CAF); c $p < 0.05$ (CT vs CT + M); d $p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = 10$ /grupo..... 63

Figura 16. Curva de ingesta dietética de las crías macho. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. b $p < 0.05$ (CT vs CAF); c $p < 0.05$ (CT vs CT + M); d $p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = 10$ /grupo..... 63

Figura 17. Duración de la sociabilidad (A), interacción con el objeto inanimado o interacción no social (B) y comparación entre interacción social y no social (C) durante la prueba de sociabilidad de 3-cámaras. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo. 65

Figura 18. Duración del tiempo total en la fase de sociabilidad en la cámara donde se encuentra el ratón extraño (A) y el objeto inanimado (B). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 66

Figura 19. Duración del olfateo al ratón (A) y número de veces de olfateos (B). Duración del olfateo al objeto inanimado (C) y número de veces de olfateos (D). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 67

Figura 20. Distancia recorrida durante la prueba de campo abierto en metros (A), duración en la zona central (B) y duración en la zona periférica (C). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 69

Figura 21. Representación gráfica de la distancia recorrida durante la prueba de campo abierto en metros. A: CT; B: CAF; C: CT+M y D: CAF+M. 70

Figura 22. Representación gráfica de la de la distribución de la duración en la zona central con relación a la zona periférica durante la prueba de campo abierto en metros. A: CT; B: CAF; C: CT+M y D: CAF+M. 70

Figura 23. Actividad total durante la prueba en porcentaje (A) e inactividad o congelamiento durante la prueba en porcentaje (B). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 71

Figura 24. Duración de los alzamientos directos durante la prueba (A), número de veces de alzamientos (B) y duración de los inclinaciones en la pared de la arena (C). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 72

Figura 25. Duración de acicalamiento durante la prueba. Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 73

Figura 26. Porcentaje de canicas enterradas durante la prueba. Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. n= 10/grupo. 74

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
5-MTHFR	5-metilenotetrahidrofolato reductasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGRP/NPY	Péptido relacionado a agouti/neuropéptido Y
APA	American Psychology Association
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
AV	Ácido valproico
BCKDK	Deshidrogenasa quinasa de cetoácidos de cadena ramificada
BTBD3	Dominio contenedor 3 de BTB
BTBR	Black and Tan Brachyury
C1C	Ciclo de un carbono
CA	Campo abierto
CAF	Cafetería
CAF+M	Cafetería + metilos
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CGI	Islas CpG ricas en CG
CH₃	Metilo
CHO	Carbohidratos
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
CKK	Colecistocinina
CLS	Estructura similar a corona (Crown like structure)
CNTNAP2	Proteína asociada a contactina 2
COBICIS	Comité de Bioética de CIDICS
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
COX-2	Ciclooxigenasa-2
COX7A2L	Subunidad 7A2 tipo citocromo C oxidasa
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CT	Control
CT+M	Control + metilos
DISC1	Interrumpido en esquizofrenia 1

DNMT	Metiltransferasa de ADN
DSM-V	Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales-5
EC	Enterramiento de canicas
ENSANUT	Estudio Nacional de Salud y Nutrición
FMR1	Proteína de retardamiento mental de X frágil
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABRB3	Subunidad beta3 de receptor tipo A de ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína acídica de glial fibrilar
GLP-1	Péptido similar a glucagón 1
HDAC	Desacetilasa de histona
HFD	Dieta alta en grasa (High fat diet)
IBA-1	Molécula ionizada de adaptador de union a calcio 1
ICR	The Institute of Cancer Research
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
ITPR3	Receptor tipo 3 de Inositol 1,4,5-trifosfato
kcal	Kilocalorías
kg	Kilogramos
LP	Lípidos
LPS	Lipopolisacáridos
m²	Metros cuadrados
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MECP2	Proteína de unión de metilo CpG 2
MES	Media del error estándar
MGLUR	Receptor de glutamato metabotrópico
MIA	Modelo de activación inmune maternal
ml	Mililitros
MTHF	Metilenotetrahidrofolato
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NF-$\kappa\beta$	Factor nuclear kappa beta
ng	Nano gramos

NLGN	Neuroglina
NMDAR	Ácido N-metil-D-aspártico
OB	Obesidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXTR	Receptor de oxitocina
POLY I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico
POMC/CART	Proopiomelanocortina/transcripción relacionada con cocaína anfetamina
PT	Proteína
S3C	Sociabilidad de 3-cámaras
SAM	S-adenosil metionina
SB	Sobrepeso
SHANK	SH3 y dominios múltiples de ankirina repetida 3
SNC	Sistema nervioso central
TBXT	Factor de transcripción de T-Box
TDAH	Trastorno de déficit de atención e hiperactividad
TEA	Trastornos del espectro autista
THF	Tetrahidrofolato
TLR-4	Receptor tipo toll-4 (Toll like receptor-4)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TOC	Trastorno obsesivo compulsivo
TSC	Complejo de esclerosis tuberoso
WOF	World Obesity Federation (Federación Mundial de Obesidad)
WT	Wild type

RESUMEN

Introducción

El estado nutricional y la alimentación materna durante el periodo perinatal y posnatal pueden programar a la descendencia para presentar alteraciones en la salud a largo plazo, incluidos los trastornos neuropsiquiátricos. Se ha identificado que la suplementación materna con donadores de metilo puede ser una estrategia preventiva para el desarrollo de estos trastornos en la descendencia.

Objetivo

Evaluar el efecto de la suplementación dietética con donadores de metilo en pruebas de comportamiento, frente a la ingesta materna de una dieta obesogénica de cafetería durante el periodo perinatal y posnatal, sobre el desarrollo de conducta similar al autismo en la descendencia en un modelo murino.

Material y Métodos

Ratones hembra madres C57BL/6 de 11 semanas de edad fueron alimentadas con diferentes dietas durante el periodo pregestacional, gestacional y posnatal durante la lactancia. Fueron divididas en los siguientes grupos: control "CT", control+metilos "CT+M", cafetería "CAF" y cafetería+metilos "CAF+M" ($n \geq 3$ /grupo). El coctel de metilos fue: ácido fólico, cobalamina, betaína y colina: 0.55mg, 0.05mg, 500mg y 537mg por cada 100g de dieta respectivamente. Al momento del destete de las crías, se les administró dieta CT. A la semana 8 posnatal, las crías macho ($n=10$ /grupo) se sometieron a 3 pruebas de comportamiento: sociabilidad de 3-cámaras, campo abierto y enterramiento de canicas. Además, se registró el peso e ingesta y se calculó la eficiencia energética en crías macho.

Resultados

Las madres CT+M tuvieron mayor ganancia de peso posnatal y mayor ingesta perinatal. Las crías de madres CAF tuvieron mayor eficiencia energética ($p < 0.01$). Las crías CT+M y CAF+M presentaron la mayor ganancia de peso y crías CT+M el mayor aumento de la ingesta ($p < 0.05$). El grupo de crías CAF presentó un déficit social ($p < 0.05$) y la suplementación con metilos (CAF+M) pudo normalizar la sociabilidad ($p < 0.05$). Las crías CT+M y CAF+M presentaron más alzamientos, representativo de la conducta tipo ansiedad ($p < 0.01$).

Conclusiones

La dieta de cafetería materna programó a las crías macho para presentar mayor eficiencia energética y alteraciones del comportamiento y la suplementación con metilos mejoró la sociabilidad, pero también promovió el comportamiento tipo ansiedad.

ABSTRACT

Introduction

Nutritional status and maternal feeding during the perinatal and postnatal periods can program the offspring to develop long-term health alterations, including neuropsychiatric disorders. Maternal supplementation with methyl donors has been identified as a preventive strategy for the development of these disorders in the offspring.

Aim

To assess the effect of dietary supplementation with methyl donors in behavioral tests, versus maternal intake of an obesogenic cafeteria diet during the perinatal and postnatal period, on the development of autism-like behavior in offspring in a murine model.

Materials and methods

Female C57BL/6 mice of 11 weeks of age were fed different diets during the pregestational, gestational, and postnatal period during lactation. They were divided into the following groups: control "CT", control + methyl "CT+M", cafeteria "CAF" and cafeteria + methyl "CAF+M" ($n \geq 3/\text{group}$). The methyl cocktail was folic acid, cobalamin, betaine, and choline: 0.55mg, 0.05mg, 500mg and 537mg per 100g of diet respectively. At weaning the pups were given a CT diet. At postnatal week 8, male pups ($n=10/\text{group}$) underwent 3 behavioural tests: 3-chamber sociability, open field, and marble burial. In addition, weight and intake were recorded and energy efficiency was calculated in male offspring.

Results

The CT+M mothers had higher postnatal weight gain and higher perinatal intake. The offspring of CAF mothers had higher energy efficiency ($p < 0.01$). The CT+M and CAF+M pups presented the highest weight gain and CT + M pups the greatest increase in intake ($p < 0.05$). The CAF group of offspring presented a social deficit ($p < 0.05$) and the supplementation with methyl (CAF+M) could normalize sociability ($p < 0.05$). The offspring CT+M and CAF+M presented more lifts, representative of anxiety-type behaviour ($p < 0.01$).

Conclusions

Maternal cafeteria diet programmed the offspring to exhibit higher energetic efficiency and, behavioural disturbances, and methyl donor supplementation improved sociability, but also moderately increased anxiety-like behaviour.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad y el sobrepeso se consideran una epidemia a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2016, a nivel global se registraron más de 1.9 billones de personas mayores de 18 años con sobrepeso, de los cuales más de 650 millones presentaban obesidad, siendo las mujeres las que presentan una mayor prevalencia (Ramamoorthy et al., 2018; WHO, 2020). En México también se ha registrado un incremento en la incidencia de obesidad sobre todo en mujeres en edad fértil (Hernández et al., 2016).

La teoría de Barker describe que la obesidad materna promueve un riesgo aumentado de presentar trastornos neuropsiquiátricos y del neurodesarrollo en la descendencia como los Trastornos del Espectro Autista o TEA (Rivera et al., 2015). En México, un estudio del 2016 reportó que 1 de cada 115 niños presentan TEA y se estima que las cifras aumenten en los próximos años (Fombonne et al., 2016).

Una alimentación materna con una dieta hipercalórica alta en grasas saturadas y azúcares simples que contiene alimentos ultra-procesados de alta palatabilidad, como la dieta occidental o la dieta de cafetería (estudios en animales), durante el período perinatal y posnatal promueve en la descendencia un patrón de metilación anormal, alteraciones a nivel de sistema nervioso central (SNC), especialmente en el comportamiento y variaciones en la composición de la microbiota intestinal y éstos se relacionan estrechamente con los mecanismos subyacentes propios de los TEA (Bolton & Bilbo, 2014; Dinan et al., 2015; Strati et al., 2017; Yochum et al., 2010). Veniaminova et al. (2017) encontró que los ratones que consumían una dieta tipo occidental presentaban interacciones sociales aberrantes, hiperlocomoción, comportamiento de entierro de canicas excesivo, un rasgo repetitivo y obsesivo y además anormalidades en función cognitiva (Veniaminova et al., 2017).

Una estrategia que puede modificar el patrón de la metilación es la alimentación. Se ha descrito que una dieta materna suplementada con donadores de grupos metilo, principalmente el ácido fólico o vitamina B₉, cobalamina o vitamina B₁₂, colina y betaína, los cuales entran al ciclo de un carbono (C1C) para donar grupos metilo al ácido desoxirribonucleico (ADN) o a las histonas a través de S-Adenosil Metionina (SAM), tiene un impacto sobre el SNC en la conducta y la cognición de la descendencia (Villamor et al., 2012). Algunos estudios clínicos y pre-clínicos que evalúan la suplementación materna con estos nutrientes sugieren que podrían prevenir el riesgo de autismo en la descendencia (Schmidt et al., 2012).

Con base en lo anterior, existe una importancia de atender esta problemática de salud pública y crear conocimiento para concientizar sobre los efectos de la obesidad y sobrealimentación materna con dietas perjudiciales para la salud sobre la descendencia, así como la creación de estrategias nutricionales preventivas o protectoras durante el período perinatal y posnatal para la disminución del riesgo de Trastornos del Espectro Autista en la descendencia.

1.1 Pregunta de investigación

¿Puede una dieta con donadores de metilo generar un efecto protector en el desarrollo de conducta similar al autismo en la descendencia de madres alimentadas con dieta de cafetería en un modelo murino a través de pruebas de comportamiento?

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

La obesidad es un proceso crónico y reincidente de la enfermedad y se caracteriza por un exceso de tejido adiposo. El índice de masa corporal (IMC) se utiliza para su clasificación y se define como el peso de una persona en kilogramos (kg) dividido por el cuadrado de su altura en metros (kg/m²). En adultos, el sobrepeso se clasifica con un IMC ≥ 25 kg/m² y la obesidad con un IMC ≥ 30 kg/m². Otros métodos para su clasificación son la circunferencia de cintura, un indicador de grasa visceral, y los puntos de corte para considerar un riesgo cardiovascular para hombres y mujeres son de >94 cm y >85 cm respectivamente, y el índice cintura-cadera que destaca si la distribución de grasa es androide o ginecoide, los puntos de corte de riesgo para hombres y mujeres son de >1 y >0.85 respectivamente (Lobstein et al., 2017; WHO, 2020).

2.1.1 Estadísticas

Según la OMS a nivel mundial en el 2016, más de 1,900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de estos, más de 650 millones presentaban obesidad. En ese mismo año, se registró que el 39% de los adultos tenían sobrepeso (39% en hombres y 40% en mujeres) y el 13% padecía obesidad (11% en hombres y 15% en mujeres), (WHO, 2020). Ver figura 1.

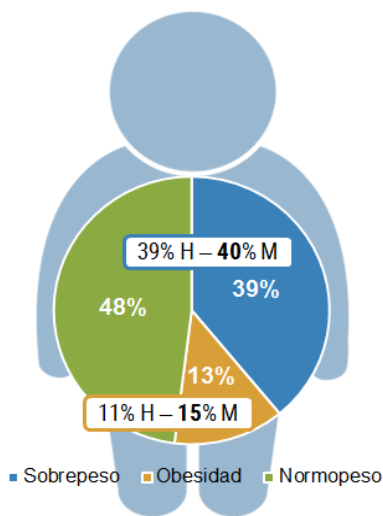


Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad mundial. Adaptado de WHO, 2020.

En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018, en adultos de 20 años y más la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad), superior a la reportada en 2012 de 71.3%. La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en hombres fue de 73% y en mujeres fue de 76.8%. La prevalencia de sobrepeso en hombres fue de 42.5% y en mujeres de 36.6% y la prevalencia de obesidad en hombres fue de 30.5% y en mujeres fue de 40.2%, mostrando que la prevalencia de obesidad es mayor en el sexo femenino (Hernández et al., 2018), ver figura 2.

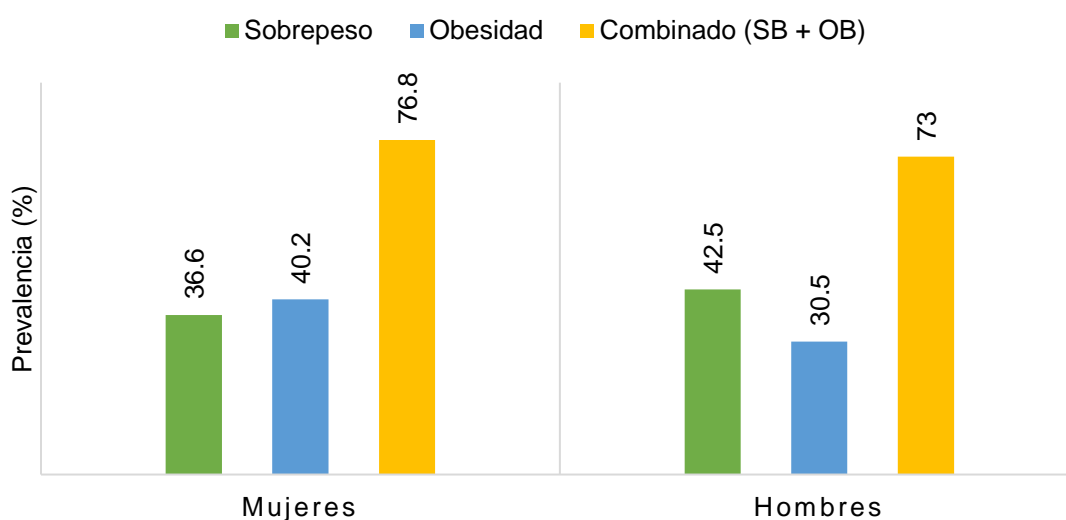


Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta mexicana. Adaptado de Hernández et al., 2018.

2.1.2 Etiología

La obesidad resulta principalmente de un desbalance crónico entre la ingesta y el gasto energético, además de una susceptibilidad genética y de mecanismos epigenéticos que pueden programar fenotipos en la adultez derivados de cambios en la función placentaria, crecimiento fetal, alelos metaestables/impronta genética. Otras variables que influyen son la disminución de la actividad de termogénesis por tejido adiposo marrón (TAM), deterioro de la actividad simpática, la composición de la microbiota intestinal, infecciones virales, disruptores endócrinos, factores socioeconómicos/socioculturales, entre otros (Galvani & Ravussin, 2008; Hruby & Hu, 2015; Sun et al., 2018).

2.1.3 Fisiopatología

El cerebro regula la ingesta de alimentos, una función clave del hipotálamo basomedial es detectar la escasez en el suministro de nutrientes. Péptidos orexigénicos como el péptido relacionado con agouti/neuropéptido-Y (AGRP/NPY) y anorexigénicos como la proopiomelanocortina/transcripción regulada de cocaína andanfetamina (POMC/CART) son sensibles a metabolitos y hormonas circulantes que indican la disponibilidad de energía como la glucosa, insulina, leptina, a péptidos producidos por el sistema gastrointestinal como el péptido similar a glucagón-1 (GLP-1) y la colecistocinina (CKK). El hipotálamo también se comunica con el sistema límbico, corteza frontal, ventral y el cuerpo estriado que regulan la toma de decisiones basada en recompensa, motivación, adicción y deseo por comidas de alta palatabilidad (Gadde et al., 2018; Prinz & Stengel, 2017).

La obesidad es causa de una inflamación crónica tanto sistémica como local. El tejido adiposo muestra una infiltración de macrófagos debido a un aumento en la producción de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). Los adipocitos superan su suministro de sangre lo que conduce a la hipoxia y necrosis. Los macrófagos envuelven a los adipocitos muertos en estructuras en forma de corona (CLS) y después se cargan de lípidos y forman células espumosas. Los ácidos grasos libres son liberados del adipocito y pueden activar el receptor tipo toll-4 (TLR-4) en la membrana plasmática de macrófagos, esto aumenta la expresión de genes proinflamatorios dependientes del factor nuclear kappa B (NF- κ B), incluida la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Iyengar et al., 2016).

Durante la obesidad, la microbiota tiene una capacidad incrementada de recolección energética de la dieta, estimula la reprogramación génica en el colon, modifica polipéptidos, hormonas y otros componentes bioactivos liberados por las células enteroendócrinas, disminuye la barrera intestinal y altera la homeostasis inmunológica. Una microbiota disbiótica repercute en la inflamación y reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo, así como en la neuroinflamación y en las señales del apetito en el cerebro (Sun et al., 2018). Ver figura 3.

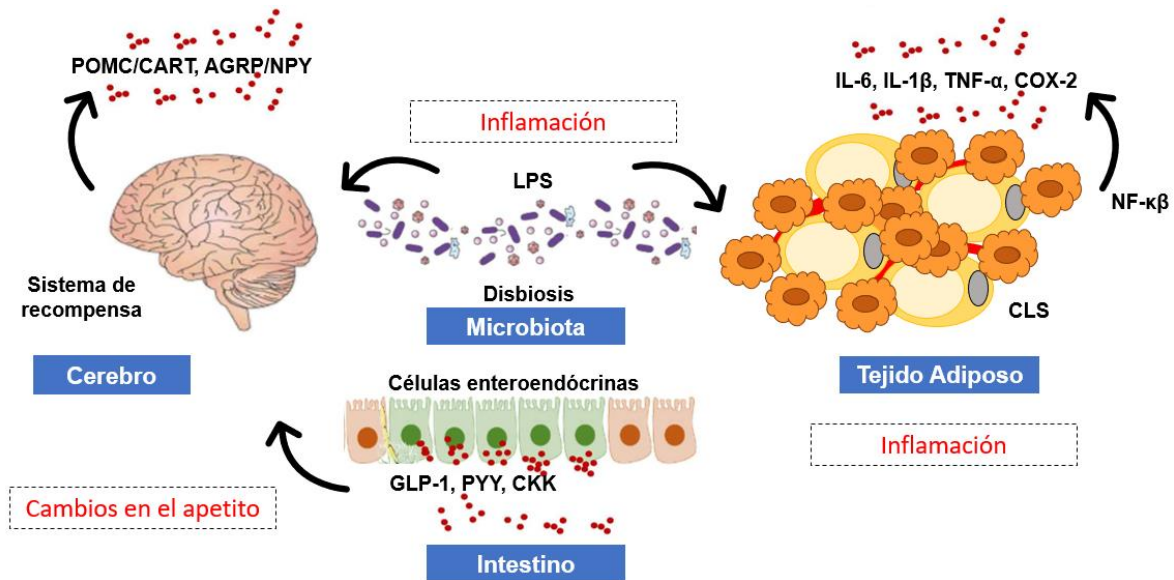


Figura 3. Mecanismos fisiopatológicos en la obesidad. La liberación de péptidos que regulan el apetito desde el intestino y el cerebro se ve alterada, al igual que las redes del sistema de recompensa. La microbiota disbiótica libera LPS que producen neuroinflamación y lipoproteínas ricas en LPS viajan al tejido adiposo para promover la inflamación. Los adipocitos por su parte se encuentran en estructura de forma de corona produciendo un ambiente proinflamatorio. Adaptado de Iyengar et al., 2016; Sun et al., 2018.

Las complicaciones de la obesidad son muy diversas y van desde la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemias, enfermedad coronaria y cerebrovascular, demencia y Alzheimer hasta diversos tipos de cáncer como el cáncer de colon, mama, endometrio y riñón. La obesidad también se ha asociado con la apnea obstructiva del sueño, asma, enfermedades autoinmunes, susceptibilidad a infecciones, esteatosis hepática, enfermedad renal, infertilidad, artritis, gota, depresión, entre otras (Kinlen et al., 2018).

Sin embargo, la obesidad no solo complica la salud del individuo que la padece, sino también la salud de la descendencia, y tomando en cuenta que la obesidad tiene una alta prevalencia en mujeres en edad fértil, se ha reportado que un estado de obesidad materna repercute en el ambiente intrauterino y resulta en un riesgo de enfermedad en edad adulta de hijos y nietos (Catalano & Shankar, 2017; Johnson et al., 2017; Reynolds & Stirrat, 2014).

2. 2 Programación por obesidad materna

La obesidad materna se basa en el IMC pregestacional (≥ 30 kg/m²). Sin embargo, un panorama más completo del ambiente perinatal obesogénico sería mediante otros parámetros además del IMC, como la ganancia de peso en el embarazo, la retención y pérdida de peso postparto, la masa magra y distribución de los depósitos de grasa corporal (Neri & Edlow, 2016). A nivel mundial la incidencia de obesidad en el embarazo es del 11 al 25%. Se estima que en México la prevalencia de obesidad durante el periodo de embarazo es de 17.6 a 27.7%. La recomendación de la ganancia de peso en mujeres embarazadas con obesidad es de 4 a 9 kg, sin embargo, cuando se excede a la recomendación hay un incremento en el riesgo de complicaciones en la madre (Cervantes Ramírez et al., 2019).

Durante el embarazo ocurren distintos cambios a nivel anatómico, fisiológico, endocrinológico y metabólico para preparar a la madre a proveer de nutrientes para el crecimiento fetal y para el parto. Durante un proceso de obesidad, se presenta una abundancia de tejido adiposo rodeando la placenta y un ambiente proinflamatorio, además de un incremento en la resistencia a la insulina y en la lipólisis (Reynolds & Stirrat, 2014). Las mujeres con obesidad pueden presentar diversas complicaciones de salud en los diferentes periodos del embarazo (Catalano & Shankar, 2017; Lim & Mahmood, 2018). Ver tabla 1.

Tabla 1. Complicaciones en el embarazo derivadas de la obesidad

Periodo	Complicaciones
Pregestacional	Infertilidad y desórdenes menstruales
Prenatal	Aborto, anomalías fetales, diabetes gestacional y preeclampsia
Intraparto	Dificultades anestésicas, hemorragia, cesárea, nacimiento del niño muerto, nacimiento prematuro iatrogénico, macrosomía fetal, mayor morbilidad y mortalidad
Posnatal	Tromboembolismo, infección en heridas, problemas para amamantar, mayor retención de peso y depresión

(Catalano & Shankar, 2017; Lim & Mahmood, 2018).

Las complicaciones de la obesidad en el embarazo no sólo afectan a la madre, sino también a la descendencia. Barker y colaboradores en 1992 reportaron una relación entre el ambiente intrauterino y el riesgo de enfermedad en la vida posterior denominado “Los Orígenes Fetales de la Enfermedad en Adultos” o “Hipótesis de Barker”. Inicialmente se documentó una correlación entre la desnutrición materna y el riesgo de enfermedad en la descendencia en edad adulta durante la Hambruna Holandesa de 1944, durante la segunda guerra mundial. Los hijos sobrevivientes de madres expuestas a inanición exhibieron una mayor incidencia de obesidad y enfermedad crónico-degenerativas (Barker, 1990; Bolton & Bilbo, 2014; Hales & Barker, 1992)

Si bien la desnutrición materna puede causar riesgos de enfermedad en la descendencia, un estado de obesidad en la actualidad presenta una mayor prevalencia y parece tener un mayor impacto (Martorell et al., 2001). En este sentido, una alta adiposidad materna puede predisponer a una mayor adiposidad en la descendencia y la lactancia materna es un factor que podría aminorar este efecto (Fewtrell et al., 2016; Martorell et al., 2001). Ver figura 4.

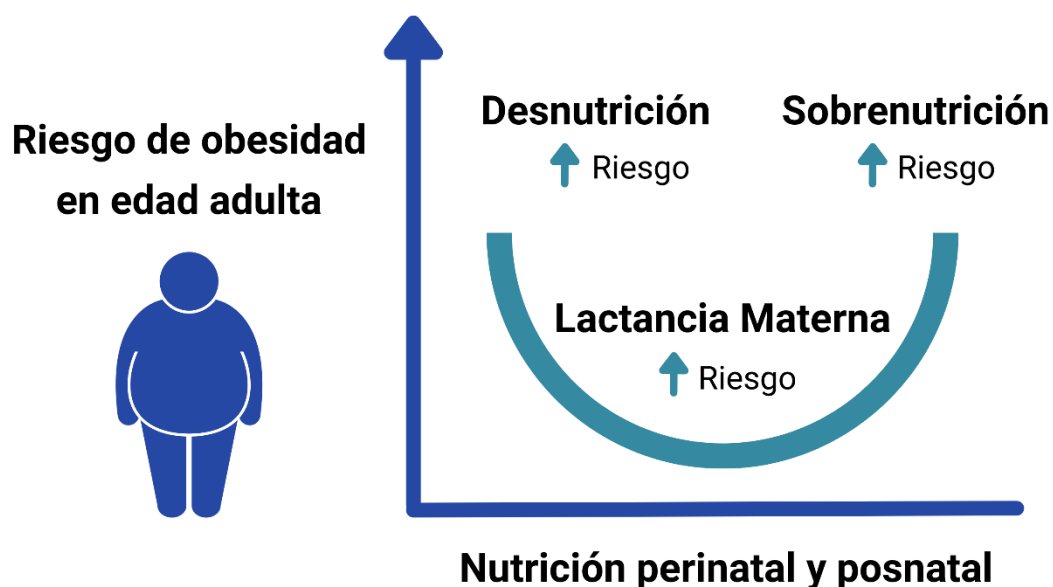


Figura 4. La teoría de Barker. Una nutrición pobre o desnutrición y una sobrenutrición materna incrementan el riesgo de obesidad en la descendencia. Adaptado de Martorell et al., 2001.

2.2.1 Programación de trastornos neuropsiquiátricos y del neurodesarrollo

La teoría de Barker no sólo hace referencia a un riesgo de obesidad y enfermedades metabólicas en la descendencia, sino también a un riesgo de enfermedades del neurodesarrollo y otros trastornos neuropsiquiátricos. La obesidad materna, el aumento en la ganancia de peso gestacional, desórdenes metabólicos maternos y una dieta materna inadecuada impactan a nivel conductual y psicológico en el infante (Rivera et al., 2015).

Los trastornos del neurodesarrollo hacen referencia a las dificultades en el desarrollo y funcionamiento cerebral, aunque no se muestren lesiones estructurales. Pueden originarse por deficiencias en la maduración de las fibras que se relacionan con la conectividad y comunicación neuronal. Las alteraciones resultantes pueden ser concernientes al lenguaje, aprendizaje, conducta, alteraciones motrices e interacción social. Algunos ejemplos de éstos son los trastornos del espectro autista (TEA) y trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (Galán-López et al., 2017). Ver tabla 2.

Tabla 2. Factores asociados a la obesidad materna y el riesgo de trastornos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos en la descendencia

Riesgo en la descendencia	Factores en obesidad materna	Fuente
Trastornos del Espectro Autista	Aumento del IMC pregestacional Aumento en la ganancia de peso gestacional	Chen et al., 2014 Bilder et al., 2013
Ansiedad/Depresión	Aumento del IMC pregestacional	Van Lieshout et al., 2013
Esquizofrenia	Aumento del IMC pregestacional Aumento en la ganancia de peso gestacional	Schaefer et al., 2000 Kawai et al., 2004
Disfunciones cognitivas	Aumento del IMC pregestacional	Tanda et al., 2013
Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	Aumento del IMC pregestacional Aumento en la ganancia de peso gestacional	Chen et al., 2014 Rodriguez et al., 2008

Galán-López et al., 2017.

2.3 Trastornos del Espectro Autista

Los trastornos del espectro autista o TEA se definen, según el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (DSM-V), como déficits persistentes en la comunicación e interacción social en múltiples contextos. En individuos con TEA existe una manifestación de déficits en la reciprocidad socioemocional, déficits en la comunicación no verbal utilizados para la interacción social, o deficiencias en el desarrollo, mantenimiento y entendimiento de relaciones sociales (American Psychiatric Association, 2013). El rango de funcionamiento varía ampliamente y la capacidad intelectual puede variar desde déficits severos hasta cerca o por encima de lo normal (Kurth et al., 2011).

2.3.1 Estadísticas del TEA

A nivel mundial, la prevalencia de los TEA es de 1 de cada 160 niños (WHO, 2019). En Estados Unidos de América, según el Center of Disease Control (CDC), la prevalencia del TEA en niños de 8 años fue de 14.6% o 1 de cada 68, de los cuales el sexo masculino tuvo 4 veces más probabilidad de ser diagnosticados con TEA que el femenino (Christensen et al., 2018). En México, un estudio de Fombonne et al. (2016) reportó que en el estado de Guanajuato existe una prevalencia del TEA de 0.87%, estimando que 1 de cada 115 niños pudieran tener esta condición. También estiman que a nivel nacional existan alrededor de 94,800 sujetos con TEA de un rango de edad de 0-4 años y 298,000 sujetos con un rango de edad de 5-19 años, sin embargo, no existen más estudios nacionales que analicen la prevalencia del TEA.

2.3.2 Mecanismos fisiopatológicos en el TEA

La extrema heterogeneidad de los TEA es un gran obstáculo para el entendimiento de su biología. Actualmente no se conoce la etiología ni la fisiopatología con exactitud, pero hay varios factores que se han relacionado con el desarrollo del autismo. Los fenotípicos clínicos en los pacientes con TEA pueden tener mucha variabilidad, incluso en gemelos monocigóticos con enfermedad concordante. Además, un cuarto de los pacientes presenta “regresiones” luego de los 2 años de desarrollarse normalmente. Algunas de las alteraciones del SNC que

se han encontrado son trayectorias anormales de crecimiento cerebral y en materia gris y blanca, desorganización cortical, alteraciones en la conectividad cerebral a nivel conductual, en la neurotransmisión excitatoria/inhibitoria a nivel celular, menor densidad neuronal, así como activación en microglía en regiones corticales y neuroinflamación, entre otras características (Chen et al., 2015).

Inicialmente se formularon varias hipótesis para explicar la causa del autismo. Kanner (1943) describió que el autismo era una enfermedad causada por factores asociados a los padres, especialmente por una falta en apego y calidez materna hacia los niños con autismo debido a que no podían entenderlos. Esto luego se denominó el efecto “madres congeladores”. Después se empezó a argumentar que el autismo era genético. Bailey et al. (2013) estudiaron una muestra de gemelos monocigotos y dicigotos encontrando que el 60% de los monocigotos presentaban autismo, en cambio, no se encontró ningún caso en los dicigotos.

Se han encontrado varias alteraciones genéticas ligadas al autismo como mutaciones en genes, como el gen deshidrogenasa quinasa cetoácida de cadena ramificada (*Bckdk*), el gen de la proteína de retraso mental frágil (*Fmr1*) o en genes de la familia SH3 y múltiples dominios de repetición de anquirina (*Shank*), variantes en genes como el receptor de oxitocina (*Oxtr*) y el receptor del ácido gamma-aminobutírico (*Gaba*) A, beta 3 (*Gabrb3*), también anomalías cromosómicas heredadas de la madre como duplicaciones en 15q11-13, entre muchas otras más alteraciones genéticas. (Chen et al., 2015; Yoo, 2015).

Existe una gran diversidad de comorbilidades en personas con TEA, éstas van desde epilepsia, ansiedad, depresión, TDAH, insomnio, parasomnia, trastornos gastrointestinales como estreñimiento, diarrea persistente, reflujo gastroesofágico, dolor abdominal, malabsorción, disbiosis, intestino permeable y trastornos en la conducta alimentaria como selectividades y problemas sensoriales. También alteraciones del sistema inmunológico como alergias, rinitis, dermatitis atópica, enfermedades autoinmunes como psoriasis, asma, entre otras (Tye et al., 2019).

La activación inmune materna (MIA) durante el embarazo también se ha propuesto como un mecanismo que podría contribuir a la etiología del autismo. Se sugiere que el perfil proinflamatorio durante la obesidad materna se asocia con un mayor riesgo de tener un hijo con autismo, esto establece defectos neuronales que conducen a anomalías de comportamiento en la descendencia como epilepsia, esquizofrenia, parálisis cerebral, Parkinson, Alzheimer y trastornos del espectro autista. De igual manera, la obesidad materna por sí sola, como se ha mencionado antes, impacta de manera importante ya que influye en un 1.39% a 1.59% en los casos de TEA. (Estes & McAllister, 2016; Knuesel et al., 2014; Maldonado-Ruiz et al., 2019).

2.4 Modelos animales de autismo

Los modelos animales de trastornos psiquiátricos se evalúan a partir de tres criterios: validación de constructo, rostro y predictiva. La validación de constructo se refiere a la racionalidad de la creación del modelo y su habilidad para mimetizar mecanismos etiológicos o consecuentes del trastorno. La validación de rostro se refiere a la capacidad de aproximación a las características fenotípicas fisiológicas y de comportamiento de las personas con el trastorno. Por último, la validación predictiva hace referencia a la habilidad de determinación de la efectividad de intervención tomando como referencia a una población clínica que presente el trastorno, aunque resulta muy desafiante, ya que actualmente no hay tratamiento para la sintomatología de TEA (Hulbert & Jiang, 2016).

2.4.1 Modelos genéticos

Los modelos murinos se usan con mayor frecuencia en las investigaciones de TEA debido a la facilidad de manipulación genética, alta accesibilidad y similitud relativamente alta con los humanos. Existen numerosos modelos genéticos de autismo en ratones y éstos exhiben comportamientos repetitivos, estereotipados, disminución en aprendizaje, entre otros rasgos fenotípicos del autismo (H. Kim et al., 2016). Ver tabla 3.

Tabla 3. Fenotipo y neurobiología de los principales modelos de autismo en líneas genéticas mutantes

	<i>Fmr1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Tsc2</i>	<i>Mecp2</i>	<i>Nlgn3</i>	<i>Shank2</i>	<i>Shank3</i>
Déficit social	+	+	+	+	+	+	+
Comportamiento repetitivo	+	+	+	+	+	+	+
Déficit cognitivo	+	+	+	+	+	+	+
Epilepsia	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.
Hiperactividad	+	-	-	-	+	+	-
Objetivo molecular	mGluR 5	mTOR	mTOR	n.d.	mGluR1	NMDAR	NMDAR

La marca “+” significa que se ha observado el fenotipo correspondiente a la línea mutante; la marca “-” significa que nunca se ha observado; n.d. significa que aún no se ha evaluado/identificado. mTOR = Diana de rapamicina en células de mamífero; mGluR1 = Receptor de glutamato metabotrópico 1; mGluR5 = Receptor de glutamato metabotrópico 5; NMDAR = Receptor de N-metil-D-aspartato. (Nöhr & Krach., 2017).

La cepa BTBR (Black and Tan Brachyury) *T⁺ Itpr3^{fl}* es otro modelo ampliamente utilizado para estudiar el comportamiento tipo autismo debido a que exhibe características como una interacción social reducida, vocalizaciones inusuales y alteración en actividades de juego. Este modelo contiene diversas alteraciones genéticas en los genes: a) Interrumpido en Esquizofrenia (*Disc1*), b) Factor de transcripción T de T-box (*Tbxt*), c) Receptor 3 de inositol 1,4,5-trifosfato (*Itpr3*) y d) Subunidad 7A2 tipo citocromo oxidasa c (*Cox7a2l*) (The Jackson Laboratory, 2020).

2.4.2 Modelos farmacológicos de programación materna

La activación del sistema inmunitario periférico en MIA y su papel en la plasticidad cerebral en TEA también se ha validado como modelo murino de autismo y utilizan la administración farmacológica materna de ácido poliinosínico:poliidílico (Poly I:C), LPS, endotoxina A e infecciones asociadas a virus (Careaga et al., 2017; S. Kim et al., 2017; Maldonado-Ruiz et al., 2019). Si bien el uso temprano de este sistema emergente de modelo TEA ha proporcionado importantes conocimientos iniciales sobre la participación de la disfunción inmune gestacional en la patogénesis, aún falta mucho por estudiar (Lammert & Lukens, 2019).

2.4.3 Modelos de programación materna por dieta obesogénica

Existen diversas dietas para inducir obesidad y alteraciones metabólicas en modelos murinos, las principales son la dieta alta en grasa y la dieta de cafetería (Higa et al., 2014). La alimentación con una dieta de cafetería (CAF) ofrece una alternativa útil para inducir obesidad, en comparación con una alimentación de alta en grasas, ver tabla 4.

Tabla 4. Composición típica de diferentes dietas experimentales

	Control	Cafetería	Alta en grasa	Western
Kcal/g	3.0	4.23	5.17	4.6
Carbohidratos	32%	56%	33.8%	39%
Proteína	31.5%	14.8%	26.1%	19.5%
Lípidos	10%	18.7%	35.5%	21.2%
Fibra	26.3%	3.2%	0.1%	20%

(Kcal/g: kilocalorías por gramo. Hyga et al., 2014; Veniaminova et al., 2017).

La dieta de cafetería induce hiperfagia persistente y, por lo tanto, una mayor ingesta de energía como resultado de la variedad y novedad de los alimentos disponibles. Aunque produce alguna variación en los alimentos y nutrientes consumidos entre animales en el mismo grupo, este patrón está más estrechamente alineado con los patrones dietéticos observados en sujetos humanos. El uso de patrones dietéticos como una medida de exposición de las relaciones dieta-enfermedad proporciona una base más sólida para cualquier efecto inferido que considerar nutrientes específicos (Akyol et al., 2012).

Una sobrealimentación materna con una dieta obesogénica alta en grasa saturada puede inducir MIA pues activa de igual manera un proceso inflamatorio y esto conduce a una modificación epigenética en células del sistema inmunológico y, por consiguiente, una expresión alterada de genes en el SNC, en este sentido, se podría implementar como modelo para estudiar el autismo (Kang et al., 2014; Maldonado-Ruiz et al., 2019).

Además, el consumo de esta dieta materna induce cambios epigenéticos en la descendencia como lo haría un modelo de ácido valproico al inhibir a la desacetilasa de histona (HDAC) (Sailer et al., 2019). Aunque un modelo de autismo relacionado a la dieta materna aún no se considera válido para estudios experimentales, se ha demostrado que puede tener un impacto en la conducta representado por alteración en la conducta social, aumento de la locomoción y comportamiento repetitivo, así como conducta tipo ansiedad elevada. Ver tabla 5.

Tabla 5. Modelos de dieta materna obesogénica

Modelo	Análisis	Resultados	Referencia
<i>Dietas obesogénicas</i>			
Ratones hembra C57BL/6 fueron alimentadas con dieta control (CT) o tipo Western (WT) por 3 semanas.	Prueba de condicionamiento de miedo, prueba de competición por comida y de interacción social y comportamiento solitario.	Interacciones sociales aberrantes, hiperlocomoción, comportamiento de entierro excesivo, anormalidades en función cognitiva en ratones con dieta WT	Veniaminova et al., 2017
Ratas hembra Wistar fueron alimentadas con una dieta CAF o CT durante la lactancia.	Prueba de campo abierto y prueba de laberinto elevado en crías.	Incremento de la actividad locomotora en la prueba de campo abierto solamente.	Speight et al., 2017
Ratas hembra Wistar consumieron una dieta CAF o CT por 8 semanas hasta el apareamiento y luego a la mitad de las ratas de cada grupo se les administró la dieta opuesta.	Prueba de campo abierto y prueba de laberinto elevado en crías.	La obesidad materna (CAF) redujo la actividad locomotora y aumentó el comportamiento tipo ansiedad.	Wright et al., 2011

2.4.4 Modelos epigenéticos

La exposición prenatal de ácido valproico (AV), un inhibidor de la desacetilasa de histona se ha ligado con un riesgo aumentado de TEA en la descendencia. Algunos de los efectos negativos de este agente son déficits sociales, aumento del comportamiento similar a la ansiedad y comportamiento repetitivo y por eso se considera un modelo de autismo (Sailer et al., 2019). Incluso

en humanos se ha encontrado que la administración *in utero* como antiepiléptico promueve un riesgo aumentado del desarrollo de TEA (Bromley et al., 2008).

Los mecanismos epigenéticos también pueden ser usados para proteger o atenuar y normalizar efectos negativos en el comportamiento en diferentes modelos de autismo. La “dieta epigenética” contiene donadores de grupos metilo: ácido fólico, betaína, colina, cobalamina, entre otros en conjunto o por separado (Li, 2018; Zhang et al., 2019). Sin embargo, aún no existen estudios que analicen el efecto de la suplementación con donadores de metilo frente a una dieta obesogénica materna como modelo de autismo.

2.5 Epigenética y el ciclo de un carbono

El ciclo de un carbono (C1C) describe reacciones incluyendo la adición, transferencia o eliminación de unidades de grupos metilo (CH_3) en vías metabólicas celulares. La vía de metilación central ocurre en el citoplasma de todas las células (Rush et al., 2014). La metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), junto con la metilación y acetilación de histonas y los microARNs (un grupo de pequeñas moléculas de ácido ribonucleico) constituyen algunos de los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica (Bolton & Bilbo, 2014). El C1C también se comunica con otras vías como la vía de transulfuración, propionato, poliaminas, fosfatidilcolina y biosíntesis de nucleótidos (Clare et al., 2019).

La metilación del ADN involucra una molécula llamada S-Adenosil Metionina (SAM) que actúa como un donador de CH_3 . Esto es catalizado por las metiltransferasas de ADN (DNMT), un factor clave en el silenciamiento epigenético de la transcripción de genes. Luego de la replicación, la DNMT1 unida al ADN, gira la base nitrogenada citosina fuera de la hélice de ADN hemimetilada y transfiere el grupo metilo a la posición 5 del anillo de la citosina. La metilación en las islas CpG (citosina-fosfato-guanina) se refiere a una actividad de DNMT de mantenimiento, mientras que la metilación en islas CpG sin grupos metilos en sus hebras es referida una como actividad de la DNMT *de novo* (Norman & Butrum, 2003).

La metilación también puede ocurrir en islas no-CpG (citosina unida a otra base nitrogenada que no es guanina) pero es restringida a células madre, ovocitos, neuronas y glías. Una vez que las islas CpG en los genes se metilan, la metilación se reproduce cada vez que se copia el gen, ver figura 6. Aproximadamente un 60-80% de las islas CpG están metiladas mientras que <10% se encuentran no metiladas y agrupadas e intercaladas dentro de secuencias pequeñas de islas CpG ricas en GC (CGIs). El genoma humano posee ~30,000 CGIs y alrededor de un 50% contiene sitios de inicio de transcripción al coincidir con genes promotores y reguladores del desarrollo (Clare et al., 2019; Zeisel, 2009).

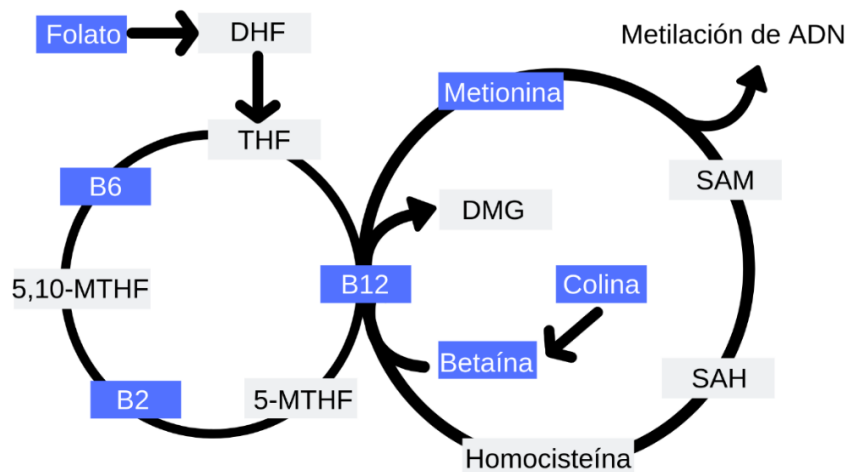
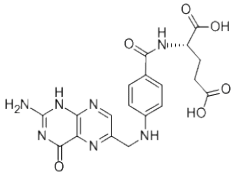
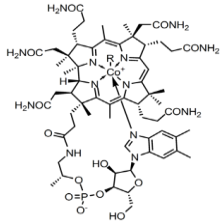
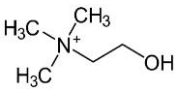
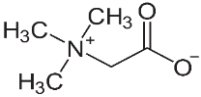


Figura 5. El Ciclo de un Carbono. La vitamina B9, vitamina B12, betaína y colina son algunos de los nutrientes que intervienen en la generación de SAM. Adaptado de Clare et al., 2019.

Existen diversos nutrientes de la dieta que participan como donadores de metilo y cofactores en el C1C como la vitamina B₉, la vitamina B₁₂, la metionina, la betaína y la colina (Figura 5). Los cambios en la disponibilidad dietética de los grupos metilo inducen alteraciones estables en la metilación de los genes alterando la expresión génica y el fenotipo resultante (Stevens et al., 2017; Zeisel, 2009). Ver tabla 6.

Tabla 6. Características de donadores de metilo

Nutriente	Estructura	Fuentes alimentarias
<p>Ácido fólico o vitamina B₉</p>		<p>Verduras de hoja verde como espinacas, leguminosas como frijoles y lentejas, frutas como plátano, carne de res, leche, huevo y cereales fortificados.</p>
<p>Cobalamina o vitamina B₁₂</p>		<p>Vísceras de res, mariscos como almejas, carne de res, aves, huevo, leche y lácteos, así como alimentos fortificados.</p>
<p>Colina</p>		<p>Yema de huevo, hígado de res, soya, carne de res, leche, cacahuates.</p>
<p>Betaína o trimetilglicina</p>		<p>Betabel, pescado, leguminosas como soya.</p>

(Ducker & Rabinowitz., 2017).

El metabolismo del ácido fólico o vitamina B₉ en el C1C se da a través de la forma activa, el tetrahidrofolato (THF). A través de diferentes enlaces covalentes las unidades de un carbono pueden mantenerse en tres estados diferentes de oxidación de carbono. Las nuevas unidades ingresan principalmente como 5,10 metilentetrahidrofolato (MTHF) utilizando la enzima 5-metilentetrahidrofolato reductasa (5-MTHFR) y vitamina B₂ como cofactor (Ducker & Rabinowitz, 2017; Fox & Stover, 2008; Shorter et al., 2015). La cobalamina funciona como cofactor para la enzima metionina sintasa que participa en la conversión de homocisteína en metionina (Mahmood, 2014).

La colina respalda la síntesis de metionina independiente del folato a través de la dimetilglicina resultante. El catabolismo de la colina comienza con su oxidación mitocondrial en dos etapas a trimetilglicina (betaína) (Ducker & Rabinowitz, 2017). La betaína remetila la homocisteína en una reacción independiente del folato. Después de esto, la betaína se convierte en dimetilglicina, que puede producir unidades adicionales de CH₃ a través de reacciones mitocondriales dependientes de folato: la dimetilglicina deshidrogenasa hace que la sarcosina y sarcosina deshidrogenasa produzcan glicina (Ducker & Rabinowitz, 2017).

La interacción gen-ambiente que modula el desarrollo cerebral se ha definido como “neuroepigenética”. Se ha ligado la deficiencia de SAM con la disrupción de la vía de metilación y con trastornos neuropsiquiátricos. Como se comentaba anteriormente, SAM es necesario para la síntesis de monoaminas como la norepinefrina, dopamina y serotonina los cuales son unos importantes neurotransmisores (Gao et al., 2018). En individuos con autismo, la alteración de la metilación del ADN puede explicar la alta tasa de concordancia en gemelos idénticos y la herencia intergeneracional baja observada en estos casos. Los patrones de metilación durante el desarrollo perinatal y posnatal pueden afectar el desarrollo y función del cerebro debido a una acumulación de epimutaciones (Tremblay & Jiang, 2019).

Estudios clínicos han encontrado que la suplementación materna con ácido fólico en el periodo perinatal ($\geq 600 \mu\text{g}$) puede reducir el riesgo de los TEA en la descendencia (Schmidt et al., 2012), sin embargo aún no se ha estudiado la relación de la suplementación de varios donadores de metilo en el contexto de autismo o comportamiento. Debido a esto los modelos animales nos pueden permitir estudiar con mayor profundidad la influencia de los donadores de metilos en la conducta. Ver tabla 7.

Tabla 7. Modelos de dieta suplementada con donadores de metilo

Modelo	Análisis	Resultados	Referencia
<i>Dietas con donadores de metilo/epigenéticas</i>			
Ratones hembra ICR se les administró AV a día embrionario 12.5. A las crías se les trató con betaína o solución salina.	Prueba de sociabilidad de 3-cámaras, prueba de duración de olfateo, prueba de enterramiento de canicas y prueba de retirada de la cola.	El tratamiento con betaína atenuó las alteraciones sociales y el comportamiento repetitivo y también normalizó la sensibilidad nociceptiva.	Huang et al., 2019
Ratones BTBR T+Itpr3tf/J hembra fueron mantenidas con dieta control y a las crías se les administró ácido fólico por 21 días a partir del día 14 posnatal.	Prueba de campo abierto, prueba de acicalamiento, prueba de sociabilidad de 3-cámaras, prueba de enterramiento de canicas, laberinto de agua de Morris en crías	La suplementación con ácido fólico redujo el comportamiento repetitivo, mejoró las interacciones sociales y atenuó las alteraciones de memoria y de aprendizaje espacial.	Zhang et al., 2019
Ratones hembra BTBR hembra y C57BL/6 fueron alimentadas con una dieta CT o suplementada con colina durante el apareamiento, embarazo y lactancia.	Prueba de campo abierto, laberinto elevado, prueba de enterramiento de canicas, prueba de sociabilidad de 3-cámaras en crías.	Crías CT-BTBR tuvieron mayor actividad locomotora, alteración social, incremento de comportamiento de entierro y la colina disminuyó el entierro y aumentó las entradas a los brazos en el laberinto elevado.	Langley et al., 2015

2.6 Análisis fenotípico de comportamiento en modelos de autismo

Para caracterizar el fenotipo de comportamiento similar al autismo en modelos murinos se utilizan pruebas de comportamiento y existe una gran variedad que se utilizan para estudiar el autismo. Una de las pruebas más utilizadas es la de Sociabilidad de 3-Cámaras (S3C) desarrollada por Jacqueline Crawley. La prueba se lleva a cabo en una arena dividida en tres cámaras y mide la interacción entre un ratón extraño que se encuentra en una cámara o un objeto que se encuentra en otra

cámara. Si el sujeto de estudio decide pasar más tiempo con el objeto inanimado significaría la presencia de un comportamiento de déficit social (Wöhr & Krach, 2017).

La prueba de campo abierto (CA) se desarrolló inicialmente en 1943 como una prueba para medir la emocionalidad en roedores, es una de las pruebas más utilizadas para medir comportamiento en la psicología animal. Ésta consiste en una arena encerrada por paredes con suficiente altura para prevenir que el sujeto escape. Una de las variables a destacar en esta prueba es la distancia recorrida y la duración del tiempo estando en la zona central o en la zona periférica de la arena. Si el ratón pasa la mayor parte del tiempo en la zona periférica significaría una mayor presencia de ansiedad (Seibenhener & Wooten, 2015).

En individuos con TEA existe una alta prevalencia de desarrollar comportamientos repetitivos llamados estereotipias motoras. Una de las pruebas que mide este comportamiento es la prueba de enterramiento de canicas (EC) que mide el porcentaje o número de canicas enterradas con relación a un número base de canicas colocadas en una superficie plana usualmente en una cama de aserrín. Si el ratón entierra casi más del 70% de las canicas significaría un comportamiento repetitivo, un porcentaje del 40 a 70% indican un comportamiento de enterramiento normal y menos de este porcentaje, una locomoción reducida o conducta neofóbica (Angoa-Pérez et al., 2013). Ver figura 6.

(A)



(B)



(C)



Figura 6. Pruebas de comportamiento relacionadas al TEA en modelos animales. Prueba de campo abierto. Esta prueba consiste en evaluar el comportamiento exploratorio, tipo ansiedad y locomoción (A). Prueba de enterramiento de canicas. Esta prueba consiste en evaluar el comportamiento repetitivo que mide la cantidad de canicas enterradas en una jaula (B). Prueba de sociabilidad de 3-cámaras. Esta prueba consiste en evaluar el comportamiento social. Se realiza en un aparato de acrílico dividido en 3 cámaras donde se colocan estímulos: en una cámara lateral se coloca al objeto inanimado y en otra un ratón extraño, luego se deja al ratón que explore las tres cámaras por 10 minutos (C).

3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el sobrepeso resultan de una interacción compleja entre múltiples factores, incluyendo influencias genéticas, fisiológicas, de comportamiento y ambientales como una sobrealimentación (Ramamoorthy et al., 2018). La creciente evidencia sugiere que el entorno perinatal puede ser especialmente importante en la configuración de la salud y enfermedad de por vida. Este es un momento crítico para la programación fetal y, por lo tanto, el estado nutricional materno durante la gestación y la lactancia puede determinar la aparición y susceptibilidad de enfermedades en la descendencia.

La alimentación materna es un factor importante en la programación fetal. Wolfrum & Peleg-Raibstein. (2018) encontraron que una sobrealimentación materna con una dieta alta en grasas incrementa el riesgo de desarrollar déficits cognitivos en la descendencia, lo que afecta procesos de aprendizaje y memoria, además puede facilitar o conducir a un envejecimiento cerebral patológico en estructuras como la corteza prefrontal e hipocampo que podrían explicar la aparición de estos déficits cognitivos.

La obesidad materna y la diabetes gestacional están asociadas a cambios en la metilación del epigenoma en la descendencia (Hjort et al., 2018; Stevens et al., 2017). Villamor et al. (2012) encontraron que una ingesta alta de folato se asocia con una mejor cognición en niños, lo cual fue comprobado mediante un test que mide el lenguaje y la inteligencia. Langley et al. (2015) encontraron que la suplementación materna con colina mejora la interacción social y el comportamiento tipo ansiedad en un modelo murino de autismo. Estos estudios apoyan la importancia de la creación de estrategias nutricionales para la prevención de autismo, dentro de estas proponemos a la suplementación con donadores de metilo.

4. HIPÓTESIS

Una dieta materna de cafetería durante el periodo perinatal y posnatal genera alteraciones en la conducta similar a la presentada en los TEA en la descendencia, así como cambios en el peso e ingesta en las madres y en la descendencia en un modelo murino.

La suplementación con donadores de metilo a la dieta materna durante el periodo perinatal y posnatal tiene un efecto protector en el desarrollo de esta conducta similar a los TEA en la descendencia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación dietética con donadores de metilo en pruebas de comportamiento, frente a la ingesta materna de una dieta de cafetería durante el periodo perinatal y posnatal sobre el desarrollo de conducta similar al autismo en la descendencia en un modelo murino.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la suplementación con donadores de metilo sobre el peso corporal y la ingesta en las madres.
2. Evaluar el efecto de la suplementación materna con donadores de metilo sobre el peso corporal, ingesta y eficiencia energética en la descendencia.
3. Determinar el efecto de la suplementación materna con donadores de metilo sobre el desarrollo de conducta similar al autismo en la descendencia mediante pruebas de comportamiento.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Este proyecto fue registrado bajo la clave: SA777-19 ante la Secretaría de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico como parte del: Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL. El responsable técnico es el Dr. Heriberto Castro García.

Para la realización del presente proyecto y cumplimiento de los objetivos general y específicos se utilizó un modelo experimental de ratones C57BL/6 (Genotipo: Wild Type o WT) en el que se estudió el efecto de la dieta materna de cafetería, la dieta con suplementación dietética con donadores de grupos metilo (colina, betaína, ácido fólico y cobalamina) y la combinación de éstas sobre la descendencia masculina de ratones madres. En la figura 7 se muestra el diagrama de flujo general del diseño experimental.

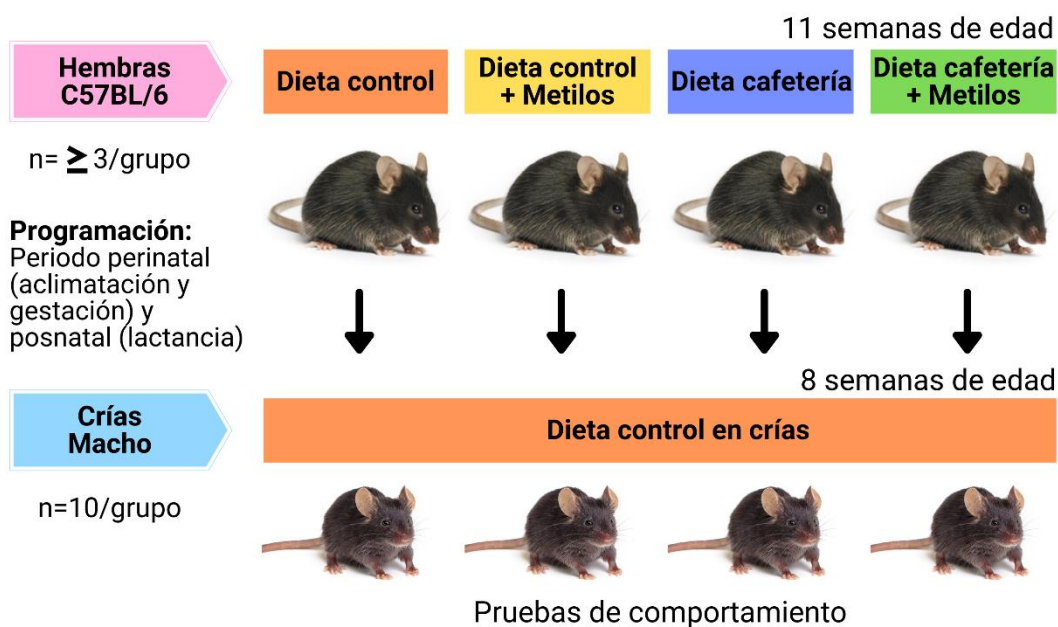


Figura 7. Diagrama de flujo del diseño experimental. Los ratones hembra se dividieron en 4 grupos dependiendo de la dieta: Control, Cafetería, Control + Metilo y Cafetería + Metilo, la cual se les dio desde el período de aclimatación, apareamiento y gestación hasta el período de lactancia o período posnatal. A las crías macho se les alimentó solamente con dieta control y a la semana 8 se les realizó las pruebas de comportamiento.

6.1.1 Ratones hembra madres

El modelo experimental se realizó en 27 ratones C57BL/6 WT hembras de 11 semanas de edad, con un peso aproximado de 21 a 22g, las cuales fueron proporcionadas por Servicios Científicos Tecnológicos y Comerciales S.A. de C.V. Tetrarium. Los animales se aclimataron durante 3 semanas en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) en la Unidad de Apoyo e Investigación en Modelos Biológicos dentro del Bioterio. Todos los ratones se alojaron en cajas de polipropileno en un ambiente de 21 a 22°C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cuatro grupos (8 ratones hembra por grupo) a los cuales se les administró una dieta experimental diferente durante 9 semanas: control (CT), control + metilos (CT+M), cafetería (CAF) y cafetería + metilos (CAF+M). Las 9 semanas corresponden a los tres períodos de intervención: período pregestacional, gestacional y posnatal, con duración de 3 semanas en cada período.

Durante la semana 4 experimental se volvió a hacer una distribución para tener de 2 a 3 ratones por jaula, posteriormente se colocó un ratón macho de la misma cepa C57BL/6 por jaula para iniciar la fase de apareamiento (1 semana). Al término de ésta se retiró al ratón macho y continuaron con sus respectivas dietas durante la gestación y lactancia. El peso de los ratones se registró tres veces por semana. Los ratones hembra se sacrificaron a través de una decapitación con guillotina mediante una previa sedación con Clorhidrato de Xilazina, y tras la disección del animal se recolectó la sangre que se almacenó 1 hora a 4°C y después se centrifugó a 1,000g durante 10 minutos para obtener el suero que finalmente se almacenó a -20°C (figura 8).

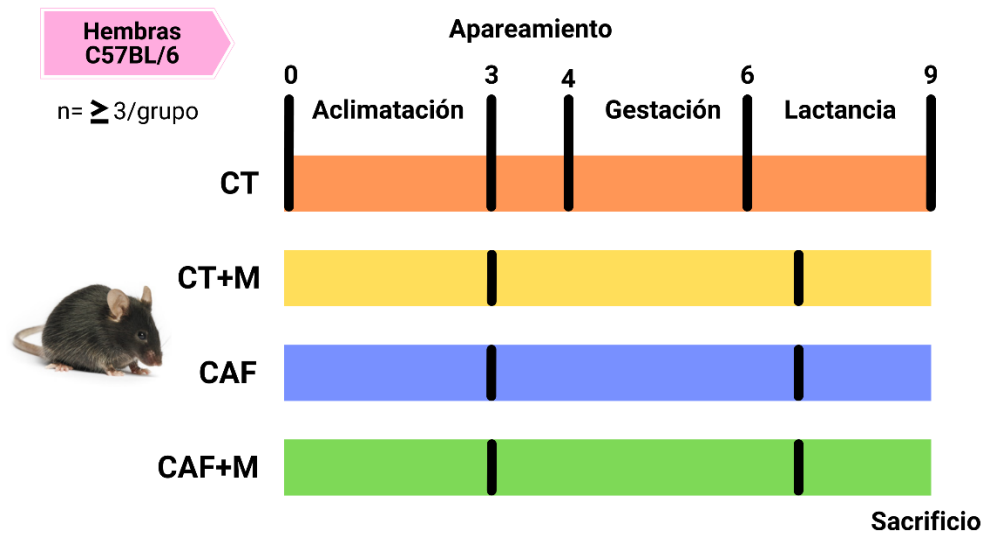


Figura 8. Gráfica del diseño experimental. La cepa utilizada será la C57BL/6, los ratones fueron divididos aleatoriamente con cuatro tipos de dieta distintos durante la etapa prenatal (6 semanas) y posnatal (3 semanas). Al finalizar el período de lactancia, las crías fueron destetadas y las madres se sacrificaron.

6.2 Dieta experimental

6.2.1 Dieta control

Para la dieta control se utilizó Rodent Lab Chow Diet 5001 obtenida por la compañía LabDiet. Ver tabla 8.

Tabla 8. Composición calórica de la dieta estándar Rodent Lab Chow 5001

Por cada 100 g	kcal	%
Energía total	335	
Hidratos de carbono	190.95	57
Lípidos	43.55	13
Proteína	100.5	30

(LabDiet, 2021).

6.2.2 Dieta cafetería

La dieta de cafetería se elaboró a base de chocolate líquido, galletas, tocino, papas fritas, pienso molido y paté de cerdo, en una proporción 1:1:1:1:1:2, respectivamente (Sampey et al., 2011). Se molieron todos los ingredientes y se mezclaron para formar una masa homogénea (tabla 9).

Tabla 9. Composición calórica de la dieta cafetería

Por cada 100 g	kcal	%
Energía total	372	
Hidratos de carbono	145.08	39
Lípidos	182.28	49
Proteína	44.64	12

(Sampey et al. 2011)

6.2.3 Dieta donadores de metilo

El protocolo utilizado para la dosificación y método de elaboración de las dietas suplementadas con donadores de metilo es el descrito por Cordero et al. (2013); Waterland et al. (2008); Wolff et al. (1998). El protocolo se basa en el peso del alimento para determinar la dosis de los nutrientes y dentro de éste se ha demostrado con anterioridad que las dosis utilizadas cambian los patrones de metilación de ADN durante el desarrollo del ratón.

Se utiliza específicamente ácido fólico, cobalamina, betaína y colina, los cuales se añaden a la dieta estándar control o la dieta cafetería y se distribuyen homogéneamente en la mezcla total del alimento. Todas las dietas se otorgaron *ad libitum*. Los donadores de grupos metilo colina (#C7017), betaína (#B3501), ácido fólico (#F7876) y cobalamina (#V2876) fueron obtenidos de la compañía SIGMA-ALDRICH (tabla 10 y 11).

Tabla 10. Composición calórica de la dieta de cafetería suplementada con donadores de metilo

Por cada 100 g	kcal	%
Energía total	372	
Hidratos de carbono	145.08	39
Lípidos	182.28	49
Proteína	44.64	12
Betaína	500*	
Colina	537*	
Ácido fólico	0.55*	
Cobalamina	0.05*	

(Waterland et al. 2008; * mg: miligramos)

Tabla 11. Composición calórica de la dieta estándar Rodent Lab Chow 5001 suplementada con donadores de metilo

Por cada 100 g	kcal	%
Energía total	335	
Hidratos de carbono	190.95	57
Lípidos	43.55	13
Proteína	100.5	30
Betaína	500*	
Colina	537*	
Ácido fólico	0.55*	
Cobalamina	0.05*	

(Waterland et al. 2008; * mg: miligramos)

6.2.4 Ratones crías macho

Las crías macho C57BL/6 (n=10 crías/grupo) fueron destetadas a la semana 3 posnatal y continuaron con dieta control hasta la semana 8. Se registró el peso corporal e ingesta semanalmente. También se calculó la ingesta energética en kcal partiendo del aporte energético estimado en la tabla 8 y el consumo en gramos promedio de cada grupo. Además se calculó la eficiencia energética para determinar el efecto de la dieta sobre la ganancia de peso final, la cual se representa como g/kcal (Grobe, 2017) con la siguiente fórmula:

$$EE = \frac{\text{Ganancia de peso en un determinado tiempo}}{\text{Kcal consumidas en un determinado tiempo}}$$

A la semana 8 posnatal las crías macho fueron sometidas a tres pruebas de comportamiento siguiendo el orden: 1) prueba de campo abierto, 2) sociabilidad de 3-cámaras y 3) enterramiento de canicas. Las crías fueron sedadas con Clorhidrato de Xilazina y posteriormente sacrificadas a la semana 10 por decapitación con guillotina. Tras la disección del animal, se recolectaron muestras de interés y se almacenaron a -80°C hasta su análisis (figura 9).

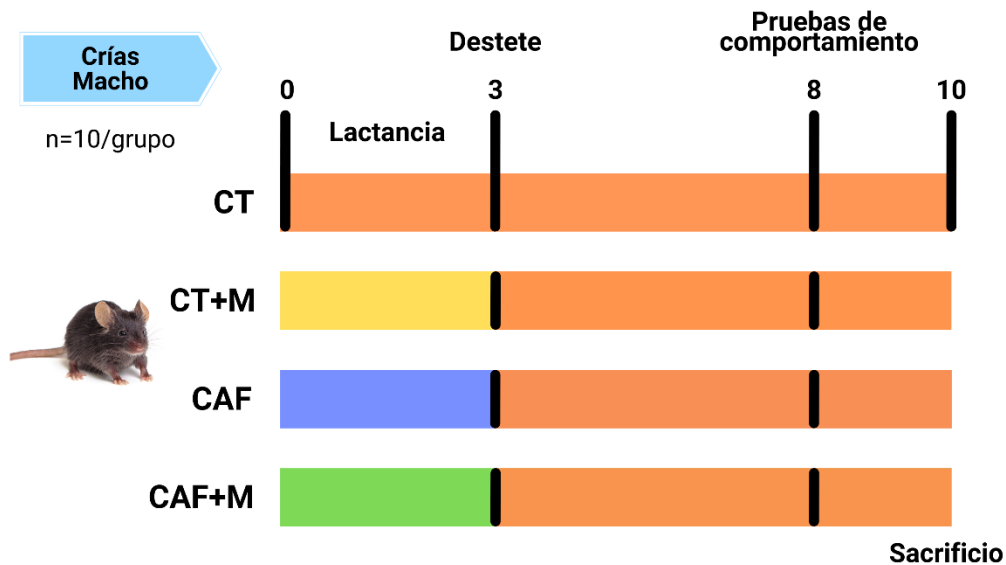


Figura 9. Gráfica del diseño experimental. Al finalizar el período de lactancia, las crías macho fueron destetadas, luego continuaron con dieta control por 7 semanas y posteriormente se realizó el sacrificio.

6.3 Análisis mediante las pruebas de comportamiento

Las pruebas que se realizaron fueron en crías macho son las siguientes: prueba de campo abierto, sociabilidad de 3-cámaras y enterramiento de canicas.

6.3.1 Prueba de campo abierto

El protocolo está diseñado para medir locomoción, exploración y comportamiento similar a la ansiedad en ratones (Seibenhener & Wooten, 2015). Esta prueba se analizó por medio de 2 observadores.

Protocolo

1. Para este análisis se usó una arena llamada campo abierto. La arena mide 50 cm (largo) x 50 cm (ancho) x 38 cm (altura) y está hecha de acrílico transparente de alta densidad y no poroso.
2. Se limpió la arena con etanol al 70% antes de usarse y antes de realizar las pruebas posteriores para eliminar cualquier rastro de olor que haya dejado el ratón anterior. Se permitió que el etanol se evaporara antes de continuar.

3. Para este análisis, se utilizó el software OMNIALVA, Inc. para registrar y evaluar los movimientos y desplazamientos del ratón.
4. Se realizaron las pruebas en una habitación iluminada estándar en un horario de 9:00 am a 6:00 pm y se utilizó la computadora requerida para ejecutar el software mediante una cámara instalada sobre la superficie de la arena.

6.3.2 Prueba de Enterramiento de canicas

El protocolo está diseñado para medir comportamientos repetitivos y compulsivos en ratones (Angoa-Pérez et al., 2013). Esta prueba se analizó por medio de 2 observadores.

Protocolo

1. Se utilizaron jaulas grandes de acrílico transparente estándar (26 cm x 48 cm x 20 cm) con tapas ajustadas para la prueba de enterramiento de canicas.
2. Se agregó material de cama de ratón fresco (aserrín) y sin aroma a cada jaula a una profundidad de 5 cm y se niveló la superficie de la cama de modo que quedara completamente plana.
3. Se colocaron 16 canicas de vidrio de juguete estándar (estilos y colores iguales de 15 mm de diámetro y 5.2 g de peso) con cuidado sobre la superficie de la cama en 4 filas de 4 canicas.
4. Se lavaron las canicas con etanol al 70% y se dejaron secar antes de cada uso.
5. Se establecieron los cronómetros o temporizadores para la duración de las sesiones (30 minutos).
6. Se colocó un ratón en una esquina de la jaula que contiene canicas, teniendo cuidado de colocar el ratón sobre la cama lo más lejos posible de las canicas, y se colocó la tapa superior en la jaula.
7. Se suspendió la administración de los alimentos y el agua durante la prueba.

8. Se retiró al ratón y se regresó a su jaula de casa después de completar la prueba, teniendo mucho cuidado de no mover o desalojar las canicas en el proceso de quitar el sujeto de la jaula.
9. Los observadores empezaron el análisis de enterramiento de canicas. Determinando que una canica había sido enterrada si el 70% de su superficie estaba cubierta por aserrín. Se hizo un conteo del número de canicas enterradas para cada ratón.
10. Se recuperaron todas las 16 canicas de la cama desechándola posteriormente.
11. La prueba se realizó en un horario de 9:00 am a 6:00 pm.
12. Una conducta normal de enterramiento contempla del 40% al 70% de las canicas enterradas, un valor más elevado sugiere un comportamiento repetitivo u obsesivo y un valor más bajo significa una locomoción disminuida o un comportamiento neofóbico.

6.3.3 Prueba de sociabilidad de 3-cámaras

Las interacciones sociales son un componente fundamental y adaptativo en la biología de muchas especies. Una variedad de desórdenes neuropsiquiátricos es caracterizada por alteraciones en la conducta social. La prueba de 3-cámaras se ha empleado para estudiar la afiliación y memoria social. Adaptado de Kaidanovich-Beilin et al. (2010). Esta prueba se analizó por medio de 2 observadores.

Protocolo

- El aparato estaba compuesto por una caja rectangular de tres cámaras. Cada cámara mide 19 x 45 cm y las paredes divisorias están hechas de acrílico transparente, con una sección central abierta, que permite el acceso libre a cada cámara.
- Se usaron dos contenedores idénticos con forma de copa y tapas extraíbles lo suficientemente grandes para sostener un solo ratón. Estos se colocaron

verticalmente dentro del aparato, uno en cada cámara lateral y una de ellas contendrá al ratón desconocido. Cada contenedor permitía el intercambio de aire entre el interior y el exterior del cilindro, pero era lo suficientemente pequeño como para evitar interacciones físicas directas entre un animal en el interior y uno en el exterior.

- La prueba de comportamiento se realizó entre las 9:00 am y las 6:00 pm.
- La iluminación general de la sala fue de 650 lux.
- Se utilizó el software OMNIALVA, Inc. para monitorear y registrar los parámetros de observación y seguimiento.
- Después de cada prueba, se limpiaron todas las cámaras con etanol al 70%.
- Los observadores debían de estar al menos 2 metros lejos del aparato y al finalizar analizaron los videos de cada ratón descritos en la sesión III del protocolo.

Preparación del animal

- Se transfirieron todas las jaulas que contenían a los ratones a la sala de comportamiento 30 minutos antes de que comenzara la prueba.
- Se requerían dos clases de ratón para este experimento, una que actuaba como un animal control, desconocido o "no familiarizado" y otra que era el sujeto de prueba. Para el ratón de control, se usó un ratón del mismo genotipo (Wild Type C57BL/6), edad (generalmente de 8 a 12 semanas), sexo (masculino o femenino) y peso, sin contacto previo (no con compañeros de camada) con el ratón sujeto.
- Previo al inicio de la prueba se aclimataron a todos los ratones control desconocidos por 3 días dentro de la jaula que se utilizaría posteriormente en la sesión de sociabilidad para que al momento de iniciar las pruebas no tuvieran un comportamiento neofóbico que perturbara el comportamiento del ratón sujeto de prueba de este proyecto.

Sesión I: Habitación

- Se aislaron los compartimentos derecho e izquierdo utilizando las paredes divisorias.
- Se colocó al ratón sujeto en el centro de la cámara central para la adaptación.
- Se dejó por un período de 10 minutos de habitación.

Sesión II: Exploración

- Se retiraron las paredes entre los compartimentos, para permitir el acceso libre y que el ratón sujeto pueda explorar cada una de las tres cámaras vacías.
- Se registró el tiempo que pasaba en cada cámara, así como el tiempo que pasaba inmóvil o “congelado” y el tiempo que pasaba acicalándose.
- La duración de la sesión fue de 10 minutos.

Sesión III: Sociabilidad

- Se aisló al ratón en la cámara central mediante la colocación de paredes divisorias para poder colocar las copas de contención, una llevaba al sujeto desconocido y la otra estaba vacía (objeto inanimado).
- Se retiraron las paredes divisorias y se dejó al ratón para que explorara e interactuara libremente.
- Se monitorearon y registraron los siguientes parámetros:
 - Duración y número de contactos directos activos (olfateos) entre el ratón sujeto y el desconocido o extraño. El contacto entre el ratón sujeto y la copa de contención, o el estiramiento del cuerpo del ratón sujeto en un área de 3-5 cm alrededor de la copa, también se cuenta como un contacto activo.
 - Duración del tiempo de “congelación” o inmovilidad.
 - Duración del tiempo de acicalamiento.

- Duración y número de entradas a cada compartimento. Se considera que el ratón está en la cámara cuando la pelvis del ratón ha entrado en la cámara.
 - Duración total de la interacción social y no social.
- La duración de la sesión fue de 10 minutos.
- Posteriormente se retiraron ambos ratones y jaulas y se procedió a limpiar con etanol al 70% para continuar con los siguientes ratones desconocidos y de estudio. Los ratones desconocidos se iban rotando entre cada prueba.

6.5 Tamaño muestral

Teniendo como referencia el artículo de Carlin et al. (2013) se estableció un número mínimo de 5-6 animales por grupo, sin embargo, por posibilidad de pérdida o muerte se emplearon 10 animales por grupo.

7. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 12. Operacionalización de las variables de estudio

Variable	Tipo de variable	Definición operacional	Unidad de medición
Dieta de cafetería	Independiente cuantitativa	Dieta derivada principalmente de calorías de carbohidratos y grasas comparadas con las dietas control. Esta dieta es la que refleja más precisamente la alimentación con alta palatabilidad y densamente energética de la sociedad occidental (Sampey et al., 2011). La medición se realiza registrando la ingesta diaria <i>ad libitum</i> por ratón por medio de una balanza analítica.	g
Dieta suplementada con donadores de grupos metilo	Independiente cuantitativa	Dieta que ha sido suplementada con nutrientes, como ácido fólico, cobalamina, metionina y colina, para incrementar los niveles de donadores de grupos metilo (S-adenosil metionina) mediante la vía de un carbono. La medición se realiza registrando la ingesta diaria <i>ad libitum</i> por ratón por medio de una balanza analítica (Shorter et al., 2015).	g
Dieta control	Independiente cuantitativa	La dieta control para roedores forma parte de la alimentación regular compuesta por subproductos agrícolas como trigo molido, maíz o avena, alfalfa y soya y fuente proteicas como pescado y aceite vegetal suplementada con minerales (Warden & Fisler, 2008). La medición se realiza registrando la ingesta diaria <i>ad libitum</i> por ratón por medio de una balanza analítica.	g
Comportamiento social	Dependiente	Las interacciones sociales son un componente fundamental y adaptativo numerosas especies. El reconocimiento social es crítico para la estructura y estabilidad de las redes y relaciones que definen las sociedades. Para los animales, como los ratones, el reconocimiento de los con específicos puede ser importante para mantener la jerarquía social y la elección de pareja. En ratones se mide por medio de pruebas como la prueba de sociabilidad de 3-cámaras que toma en cuenta: el tiempo que pasa socializando con un objeto	-Duración y número de contactos directos entre el ratón desconocido. -Duración del tiempo de "congelación" o inmovilidad. -Duración y número de entradas a cada compartimento.

		inanimado y con un sujeto extraño, así como el número de contactos físicos directos (Kaidanovich-Beilin et al., 2010).	
Comportamiento tipo ansiedad	Dependiente	<p>El estrés es un factor desencadenante de los trastornos relacionados con la ansiedad, que se encuentran entre las principales formas de discapacidad y enfermedad psiquiátrica en el mundo moderno. Las pruebas y modelos de comportamiento basados en roedores se utilizan ampliamente. Unas de las pruebas para evaluar esto es la prueba de campo abierto que analiza la ansiedad y locomoción del ratón a través de la latencia de entrar y pasar tiempo en el centro de la arena donde es "vulnerable" a depredadores (Lezak et al., 2017).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Número de veces que cruza el centro de la arena. -Tiempo que pasa en el centro. -Número de veces que pasa en las esquinas. -Tiempo que pasa en las esquinas de la arena.
Comportamiento repetitivo	Dependiente	<p>El comportamiento repetitivo debe repetirse a un ritmo relativamente alto, perseguido de forma invariable y considerado inapropiado y anormal en su manifestación y exhibición. En ratones se puede medir a través de distintas pruebas como la de Auto-Acicalamiento y Enterramiento de canicas. Esta última consiste en evaluar la cantidad de canicas que entierra por 30 minutos (Kim et al., 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Número de canicas enterradas. -Porcentaje de canicas enterradas.

8. PLAN DE ANÁLISIS

Los resultados se presentan como media \pm el error estándar (MES). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS versión 25.0. Se realizó prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar los efectos sobre el peso y la ingesta. Se utilizó una ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la suplementación materna sobre el comportamiento en la descendencia. Para estudiar las diferencias individuales entre grupos de experimentación se utilizó prueba post hoc de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Para graficar los resultados se utilizó el programa GraphPad versión 8.0.

9. RECURSOS

El proyecto se desarrolló en las Unidades de Nutrición, Neurometabolismo, Modelos Biológicos y Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS).

Equipos

- Aparato acrílico para prueba de Campo Abierto.
- Aparato acrílico para prueba de Sociabilidad de 3 Cámaras.
- Aparato acrílico para prueba de Enterramiento de canicas.
- Cámara de grabación.
- Software de análisis y videograbación.

Materiales

- Donadores de grupos metilo cobalamina, ácido fólico, betaína y colina (Sigma-Aldrich).
- Ratones hembra y macho C57BL/6.
- Etanol al 70%.

9.1 Financieros

Proyecto financiado por PAICYT SA777-19.

9.2 Humanos

Participaron investigadores de las Unidades antes mencionadas del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), así como asistentes, becarios y técnicos de laboratorio.

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El presente proyecto de investigación se apegó a las condiciones y lineamiento de trabajo a llevar a cabo en un laboratorio establecidas por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León (COBICIS).

Estos comités se basan en el cumplimiento de tres normas mexicanas: la “NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, en la cual se estipulan disposiciones generales concernientes al tipo de alimento, tipo y zona de identificación, espacios de jaulas, camas/nidos, manejo del animal, entre otras. Otra normativa utilizada es la “Ley Federal de Sanidad Animal (Reforma 07-06-2012)”, que hace referencia a las medidas zoonosológicas para proteger la vida, salud y bienestar de los animales. La tercera normativa empleada es la “Ley de protección y bienestar animal para la sustentabilidad del estado de Nuevo León (Reforma 07-06-2012)”, que habla sobre bienestar, atención veterinaria por un Médico Veterinario Zootecnista, métodos de sacrificio o eutanasia, entre otras. El principio de las 3 Rs: “Reemplazar, Reducir y Refinar se cumplirá en cuanto a la disminución del sufrimiento y estrés en animales, así como el sufrimiento al momento del sacrificio para lo cual se empleará el uso de sedación con Clorhidrato de Xilazina.

Durante la estancia en el laboratorio se hizo uso de: bata, guantes, cubre calzas, cofia, cubrebocas y lentes protectores. Todos los desechos contaminados con sangre se depositaron en las bolsas rojas. Todos los residuos biológicos se desecharon en bolsas RPBI (Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos) que luego se almacenaron en congelación para luego ser incineradas, según lo marca la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

11. RESULTADOS

11.1 Ratones C57BL/6 hembras madres

Con el fin de analizar los efectos de la dieta en los ratones hembra se registró su peso e ingesta 3 veces a la semana durante el periodo pregestacional, gestacional y posnatal. Las tablas 13 muestra el peso y la ingesta promedio por grupos, en la cual se observa que las madres que con dieta CAF (CAF y CAF+M) presentan mayor peso corporal ($p < 0.05$), así como mayor ingesta que las madres con dieta CT ($p < 0.01$), también se observó que las madres con dieta CT+M tuviera mayor ingesta que las madres CT ($p < 0.01$). La tabla 14 muestra que la ganancia de peso total fue mayor en los grupos que fueron suplementados los donadores de metilo que el en grupo CT ($p < 0.05$). También hubo mayor ingesta energética medida en kcal y mayor eficiencia energética en todos los grupos en comparación con el grupo CT ($p < 0.01$).

Tabla 13. Datos basales de peso e ingesta en las madres

Dieta materna	Peso corporal (g)	Ingesta dietética (g)
Control	19.14 ± 0.3	6.30 ± 0.2
Cafetería	22.55 ± 0.6*	8.66 ± 0.1**
Control + Metilos	21.53 ± 0.4	10.0 ± 0.0**
Cafetería + Metilos	22.48 ± 0.8*	10.0 ± 0.0**

La diferencia entre grupos fue analizada mediante prueba ANOVA de una vía y prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$ (vs CT), ** $p < 0.01$ (vs CT). $n \geq 3/\text{grupo}$.

Tabla 14. Estado nutricional de las madres en el periodo perinatal y lactancia

Dieta materna	Ganancia de peso (g)	Ingesta energética (Kcal)	Eficiencia energética (g/Kcal)
Control	14.33 ± 1.4	518.79 ± 4.2	0.02 ± 0.002
Cafetería	9.20 ± 1.6	395.87 ± 5.8 ^{a, c}	0.02 ± 0.003 ^c
Control + Metilos	5.19 ± 0.1 ^a	605.00 ± 9.7 ^{a, b, d}	0.008 ± 0.0002 ^{a, b}
Cafetería + Metilos	5.19 ± 1.4 ^a	431.79 ± 10.39 ^{a, c}	0.01 ± 0.003 ^a

La diferencia entre grupos fue analizada mediante prueba ANOVA de una vía y prueba de Tukey como post hoc. ^a $p < 0.05$ (vs CT), ^b $p < 0.05$ (vs CAF), ^c $p < 0.05$ (vs CT + M), ^d $p < 0.05$ (vs CAF + M). $n \geq 3/\text{grupo}$.

11.1.1 Ganancia de peso

Durante el periodo pregestacional se registró el peso durante 3 semanas incluyendo el peso final antes del periodo de apareamiento. En el período gestacional se registró el peso durante las 2 semanas del apareamiento y las 3 semanas de gestación y durante el período posnatal se registró el peso durante las 3 semanas que incluyen el periodo de lactancia hasta el destete de las crías.

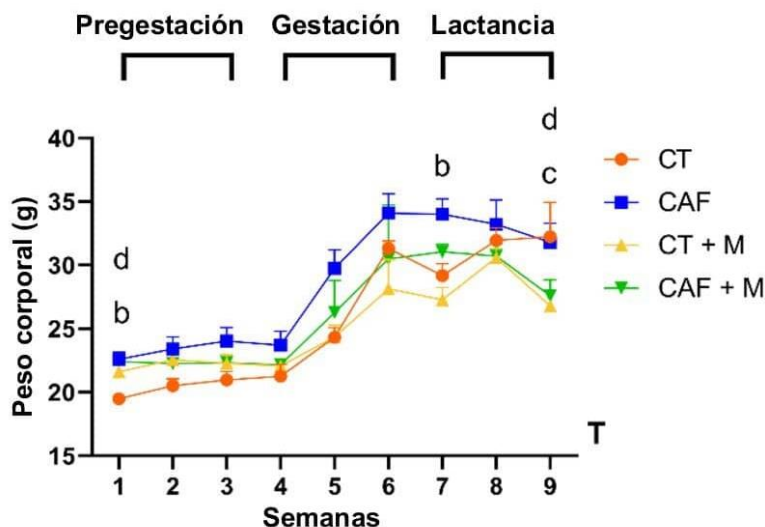


Figura 10. Peso corporal de las madres. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. b $p < 0.05$ (CT vs CAF); c $p < 0.05$ (CT vs CT + M); d $p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n \geq 3$ /grupo.

La figura 10 muestra la curva de ganancia de peso corporal durante toda la vida de las madres. Las semanas 1, 2 y 3 corresponden al período pregestacional, las semanas 4, 5 y 6 corresponden al período gestacional y las semanas 7, 8 y 9 corresponden al período posnatal. Durante el periodo pregestacional los grupos CAF y CAF+M mostraron mayor peso a la semana 1 en comparación con el grupo control ($p < 0.05$), este comportamiento fue similar en los datos basales (Tabla 13). Todos los grupos mostraron un incremento del peso en el periodo pregestacional, sin llegar a ser estadísticamente significativo. Durante el periodo de lactancia en la semana 7 el grupo CAF indicó mayor peso respecto al grupo CT ($p < 0.05$). Por otra parte, los dos grupos suplementados (CT + M y CAF + M) tuvieron una disminución en el peso corporal a la semana 7 en comparación con el grupo CT ($p < 0.05$).

11.1.2 Ingesta dietética

Durante el periodo pregestacional se registró la ingesta durante 3 semanas incluyendo el peso durante el apareamiento. En el período gestacional se registró la ingesta durante las 2 semanas del apareamiento y las 3 semanas de gestación y durante el período posnatal se registró la ingesta durante las 3 semanas que incluyen el periodo de lactancia hasta el destete de las crías.

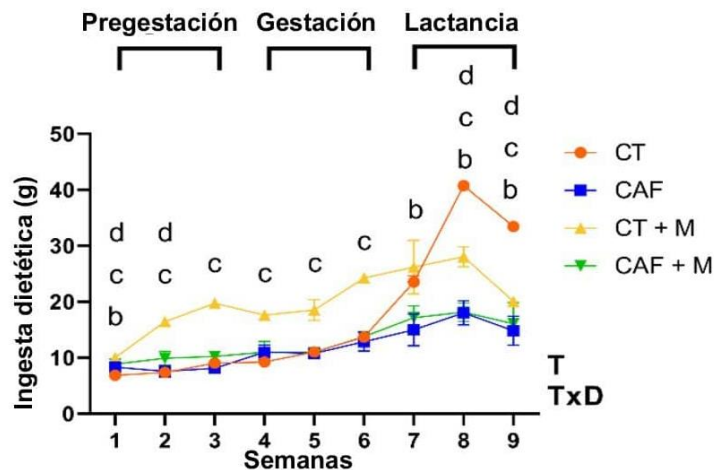


Figura 14. Curva de ingesta dietética durante toda la vida en madres. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. b $p < 0.05$ (CT vs CAF); c $p < 0.05$ (CT vs CT + M); d $p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = \geq 3/\text{grupo}$.

La figura 14 muestra la curva de la aumento de ingesta durante toda la vida de los ratones hembra madres. Las semanas 1, 2 y 3 corresponden al período pregestacional, las semanas 4, 5 y 6 al período gestacional y las semanas 7, 8 y 9 al período posnatal. Todos los grupos tuvieron mayor ingesta durante el período pregestacional en comparación con el grupo CT ($p < 0.05$). Durante la gestación el grupo CT+M tuvo mayor ingesta durante las semanas 4, 5 y 6 comparado con el grupo CT ($p < 0.05$).

Durante el periodo de lactancia, todos los grupos indicaron un comportamiento dietético distinto al grupo CT, en donde se pudo observar una disminución en la ingesta respecto al grupo CT en las semanas 8 y 9 ($p < 0.05$). Además, los grupos control (CT+M y CT) mostraron mayor consumo en kcal (605.00 ± 9.7 y 518.79 ± 4.2 respectivamente) en comparación con el resto de los grupos. Los grupos CT y CAF presentaron mayor eficiencia energética (0.02 ± 0.002 y 0.02 ± 0.003) comparados con el resto de los grupos.

11.2 Ratones C57BL/6 macho crías

Efecto de la dieta y suplementación con donadores de metilo sobre parámetros de peso e ingesta en la descendencia de ratones macho. Se muestran los parámetros obtenidos a lo largo del periodo experimental entre las crías de que pertenecen a madres del grupo CT, CAF, CT+M y CAF+M. El registro de peso e ingesta de las crías se realizó 3 veces a la semana.

11.2.1 Ganancia de peso

El peso en los ratones macho crías se registró a partir del destete en la semana 3 de vida y hasta la semana 8 de vida. En la figura 15 se muestra la curva de peso desde la semana 3 hasta la semana 8 de vida. Las crías CAF mostraron menor peso corporal a las semanas 4 ($p < 0.05$), 5 ($p < 0.001$), 6 ($p < 0.01$), y 7 ($p < 0.05$) en comparación al grupo control.

Los dos grupos suplementados (CT + M y CAF + M) indicaron menor peso corporal respecto al grupo control solo en la semana 3 ($p < 0.05$). Sin embargo, al evaluar la ganancia de peso final los grupos suplementados (CT + M y CAF + M) presentaron mayores valores, lo que indica que la suplementación materna ejerce un efecto al incrementar el peso corporal de la descendencia, independientemente del tipo de dieta aplicada (Tabla 15).

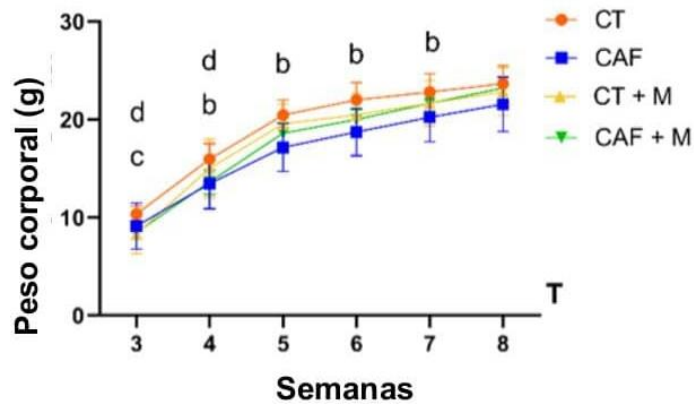


Figura 15. Peso corporal de las crías macho. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. $b p < 0.05$ (CT vs CAF); $c p < 0.05$ (CT vs CT + M); $d p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = 10/\text{grupo}$.

11.2.2 Ingesta dietética

La ingesta en los ratones macho crías se registró a partir del destete en la semana 3 de vida y hasta la semana 8.

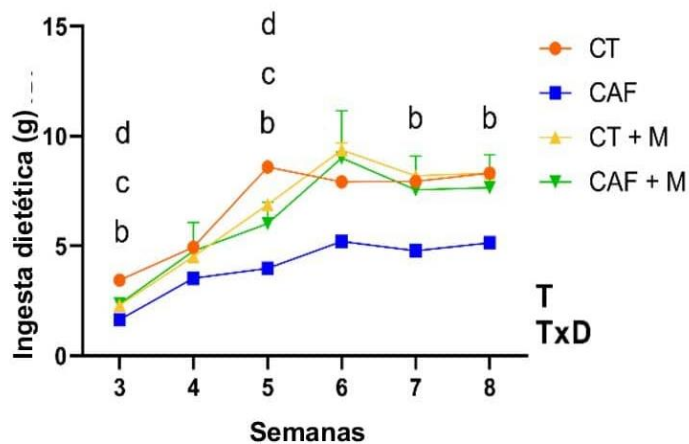


Figura 16. Curva de ingesta dietética de las crías macho. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. Los resultados se expresan como media \pm MES. El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto tiempo (T), dieta (D) o efecto interactivo Tiempo X Dieta (TxD). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. $b p < 0.05$ (CT vs CAF); $c p < 0.05$ (CT vs CT + M); $d p < 0.05$ (CT vs CAF + M). $n = 10/\text{grupo}$.

La figura 16 representa la curva de ingesta dietética durante toda la vida de los ratones cría machos donde se pueden observar las variaciones entre cada semana desde la 3 hasta la semana 8 de vida. Las crías CAF presentaron una menor ingesta respecto al grupo CT en la semana 3 ($p < 0.001$), 5 ($p < 0.001$), 7 ($p < 0.05$) y 8 ($p < 0.01$). Las crías CT+M y CAF+M consumieron menos que CT en la semana 3 y 5 ($p < 0.05$). Aunque las crías del grupo cafetería consumió menor cantidad de calorías (81.32 ± 1.0), estos animales presentaron una mayor eficiencia energética respecto a los grupos CT ($p < 0.001$) y CT+M ($p < 0.01$). Además, las crías del grupo CAF+ M presentaron mayor eficiencia energética (0.15 ± 0.0) en comparación con los grupos CT ($p < 0.001$) y CT+M ($p < 0.01$).

Tabla 15. Eficiencia energética en crías macho

Dieta materna	Ganancia de peso final (g)	Ingesta energética total (kcal)	Eficiencia energética (g/kcal)
Control	13.30 ± 0.3	137.84 ± 0.6	0.09 ± 0.003
Cafetería	12.42 ± 0.6 ^{c, d}	81.32 ± 1.0 ^{a, c, d}	0.15 ± 0.01 ^{a, c}
Control + Metilos	14.54 ± 0.5 ^b	132.58 ± 4.3 ^b	0.11 ± 0.01 ^{b, d}
Cafetería + Metilos	14.76 ± 0.3 ^b	125.15 ± 24.7 ^b	0.15 ± 0.02 ^{a, c}

La diferencia entre grupos fue analizada mediante prueba ANOVA de una vía y prueba de Tukey como post hoc. a $p < 0.05$ (vs CT), b $p < 0.05$ (vs CAF), c $p < 0.05$ (vs CT + M), d $p < 0.05$ (vs CAF + M). n= 10/grupo

11.2.3 Pruebas de comportamiento

Efecto de la dieta y suplementación materna sobre el comportamiento similar al autismo en ratones macho crías a través de 3 pruebas de comportamiento las cuales son: prueba de sociabilidad de 3-cámaras, campo abierto y enterramiento de canicas que analizan los comportamientos social, tipo ansiedad y repetitivo, respectivamente. Las pruebas se realizaron durante la semana 8.

11.2.4 Prueba de sociabilidad de 3-cámaras

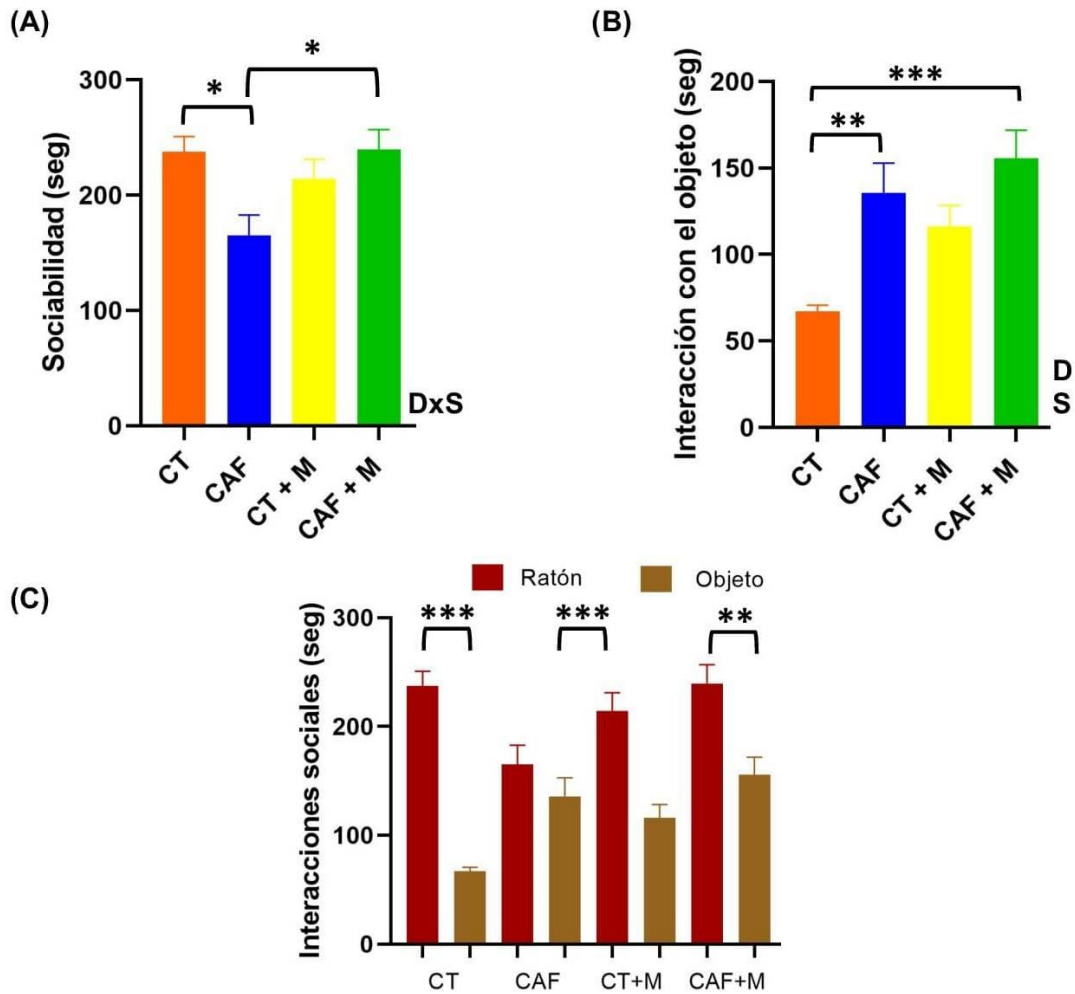


Figura 17. Duración de la sociabilidad (A), interacción con el objeto inanimado o interacción no social (B) y comparación entre interacción social y no social (C) durante la prueba de sociabilidad de 3-cámaras. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

La figura 17 muestra los resultados de la duración de la interacción social con el ratón extraño y con el objeto inanimado. El grupo cafetería presentó una menor sociabilidad (165.42 ± 17) con el ratón extraño ($p < 0.05$), además, se observó una mayor interacción con el objeto (135.79 ± 17) en comparación con el grupo control ($p < 0.01$). En este mismo sentido, las crías del grupo CAF+M tuvieron mayor interacción con el objeto inanimado (155.60 ± 16) comparado con las crías del grupo control ($p < 0.001$) indicando que una dieta materna de cafería suplementada o no,

puede promover una alteración en el comportamiento, al menos en este parámetro. Por otra parte, el grupo CAF+M presentó un incremento en el tiempo utilizado en la socialización (239.61 ± 17) con el ratón extraño comparado con el grupo cafetería ($p < 0.05$). Al comparar las dos interacciones (social y no social), todos los grupos experimentales tuvieron una mayor interacción significativa ($p < 0.001$) con el ratón extraño a excepción del grupo cafetería.

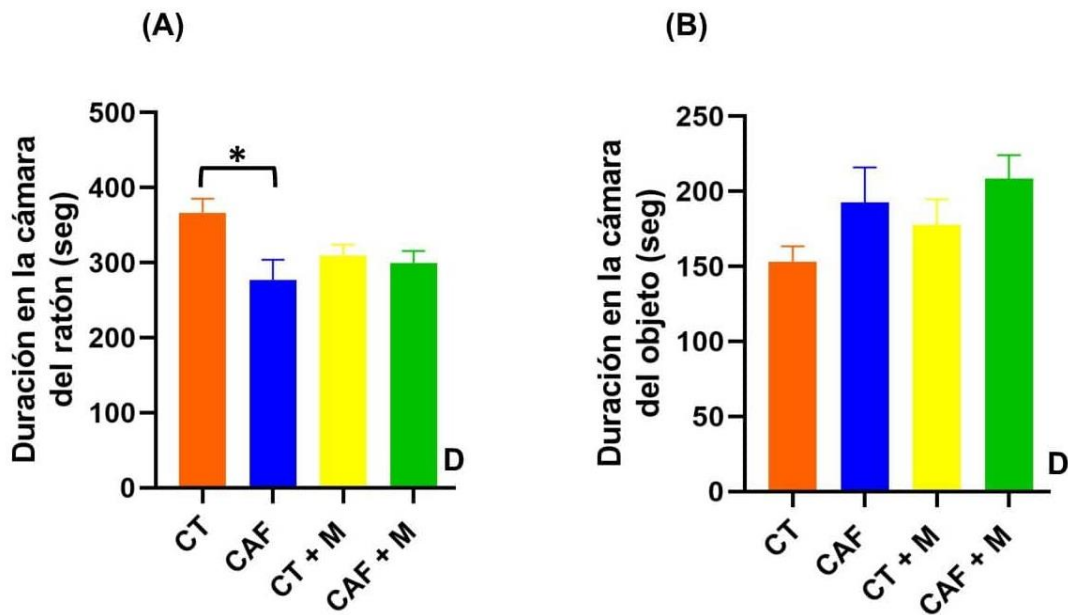


Figura 18. Duración del tiempo total en la fase de sociabilidad en la cámara donde se encuentra el ratón extraño (A) y el objeto inanimado (B). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10/\text{grupo}$.

En la figura 18 se muestra la duración total en las cámaras donde se encuentra el ratón y donde se encuentra el objeto inanimado durante la fase 3 de sociabilidad donde ya se encuentran los estímulos en cada cámara. Este parámetro mide la duración en la cámara, aunque no haya contactos directos con el estímulo. Las crías del grupo CAF estuvieron un menor tiempo en la cámara del ratón extraño (277.47 ± 26) en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). No se encontró una diferencia significativa entre los grupos respecto al tiempo que estuvieron en la cámara del objeto.

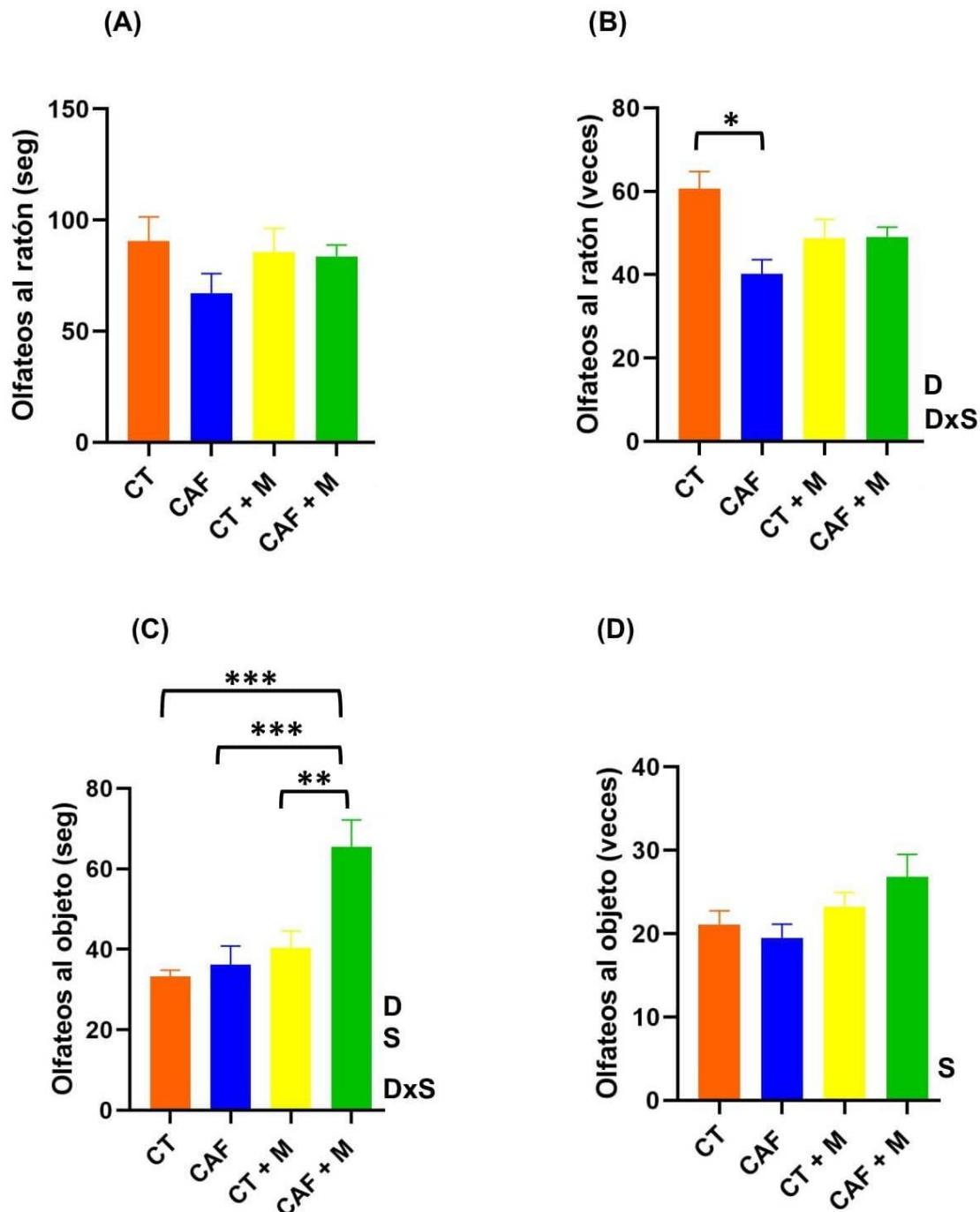


Figura 19. Duración del olfateo al ratón (A) y número de veces de olfateos (B). Duración del olfateo al objeto inanimado (C) y número de veces de olfateos (D). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

En la figura 19.A se muestra la duración de los olfateos al ratón extraño. No se observó diferencia significativa entre los grupos respecto al tiempo de olfateos al ratón extraño, sin embargo, las crías del grupo cafetería presentaron un menor número de olfateos al ratón extraño (40.20 ± 3.4) comparado con el grupo control ($p < 0.05$). Por otra parte, las crías del grupo CAF+M pasaron mayor tiempo olfateando al objeto (65.50 ± 6.6) en comparación con el resto de los grupos experimentales ($p < 0.001$). Finalmente, no se encontró diferencia significativa en el número de olfateos al objeto entre los grupos experimentales. En cuanto al grupo CT+M también olfateó menos al objeto en comparación con CAF+M ($p < 0.01$).

11.2.5 Prueba de campo abierto

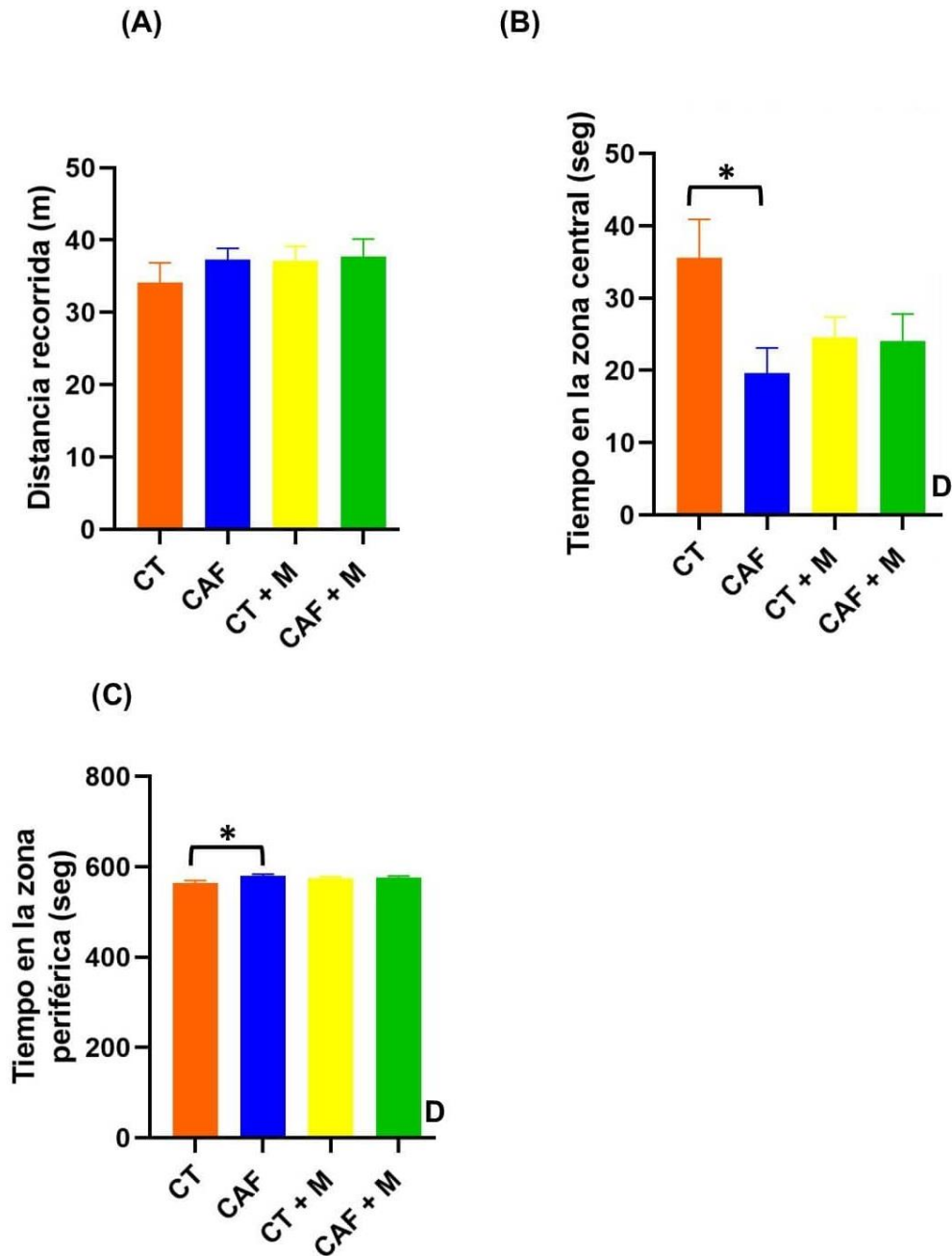


Figura 20. Distancia recorrida durante la prueba de campo abierto en metros (A), duración en la zona central (B) y duración en la zona periférica (C). Los resultados se expresan como media \pm M.E.S. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

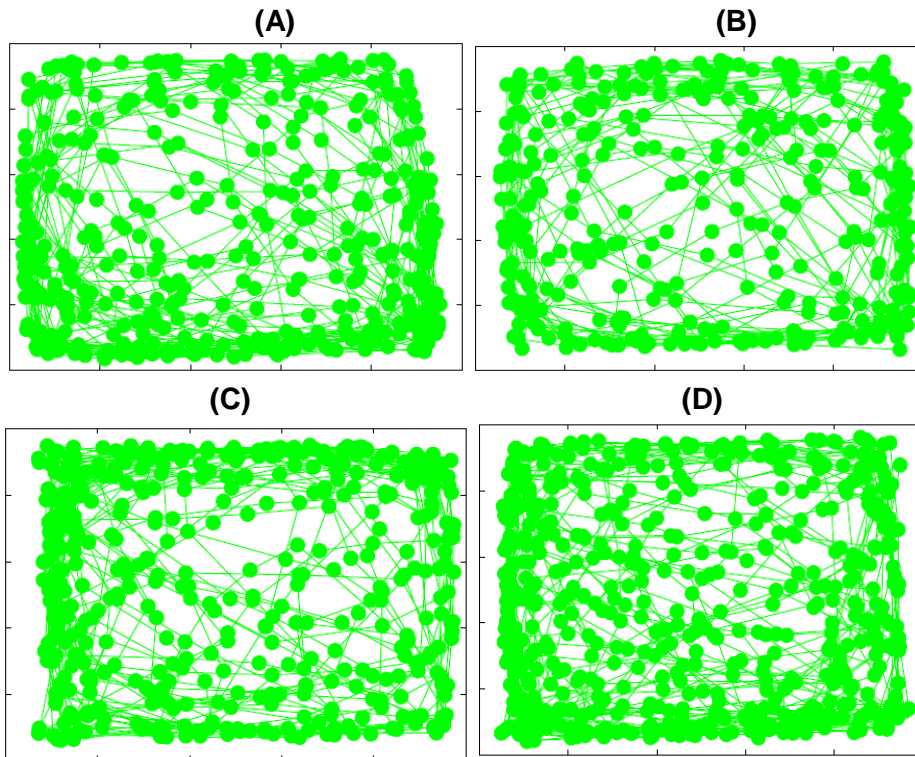


Figura 21. Representación gráfica de la distancia recorrida durante la prueba de campo abierto en metros. A: CT; B: CAF; C: CT+M y D: CAF+M.

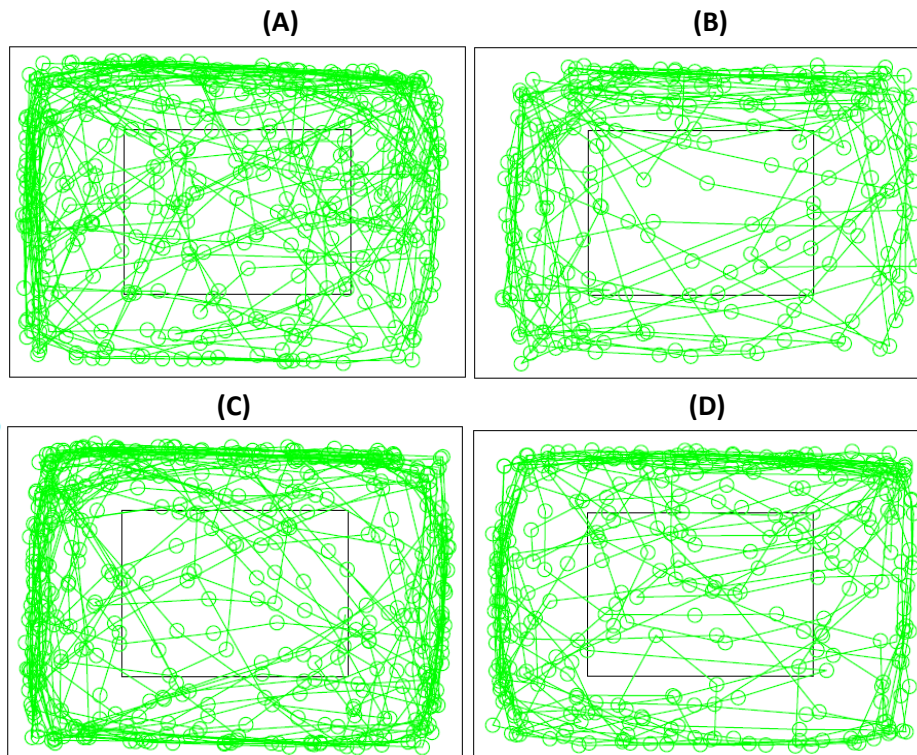


Figura 22. Representación gráfica de la de la distribución de la duración en la zona central con relación a la zona periférica durante la prueba de campo abierto en metros. A: CT; B: CAF; C: CT+M y D: CAF+M.

Las crías del grupo cafetería se mantuvieron menos tiempo (seg) en la zona central (19.58 ± 3.5) y un mayor tiempo en la zona periférica (580.40 ± 3.5) en comparación con el grupo control ($p < 0.05$), lo cual podría ser indicador de un comportamiento tipo ansiedad (Figura 20). Por otra parte, no se encontró una diferencia significativa respecto al parámetro de distancia recorrida (m).

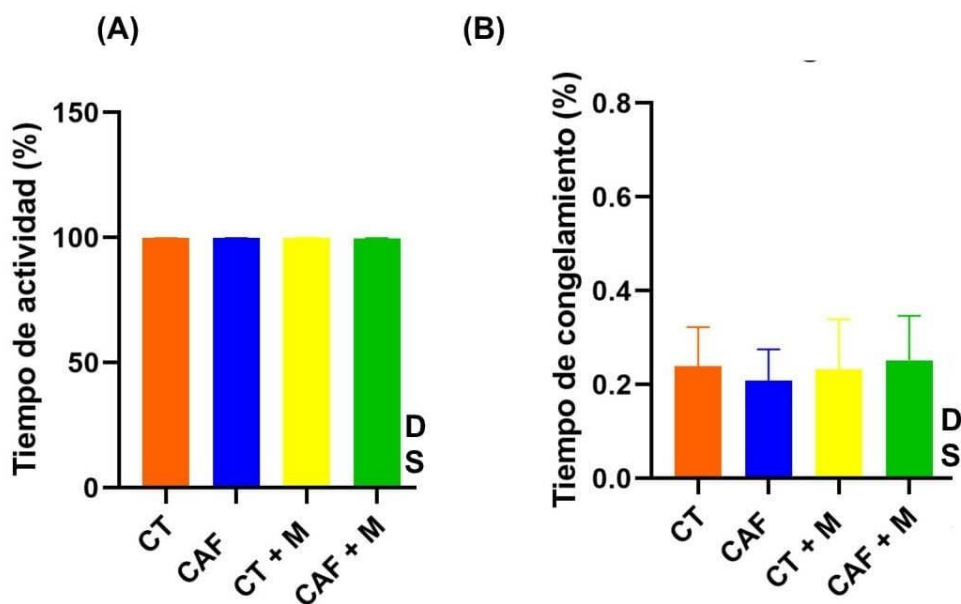


Figura 23. Actividad total durante la prueba en porcentaje (A) e inactividad o congelamiento durante la prueba en porcentaje (B). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

Respecto a los porcentajes de actividad o movilidad y de inactividad o inmovilidad durante la prueba de CA tampoco se reportan resultados que representen diferencias estadísticamente significativas debido a que los valores son muy similares, por ejemplo, en la figura 23.A, como también muy variables entre cada ratón de los diferentes grupos experimentales (23.B).

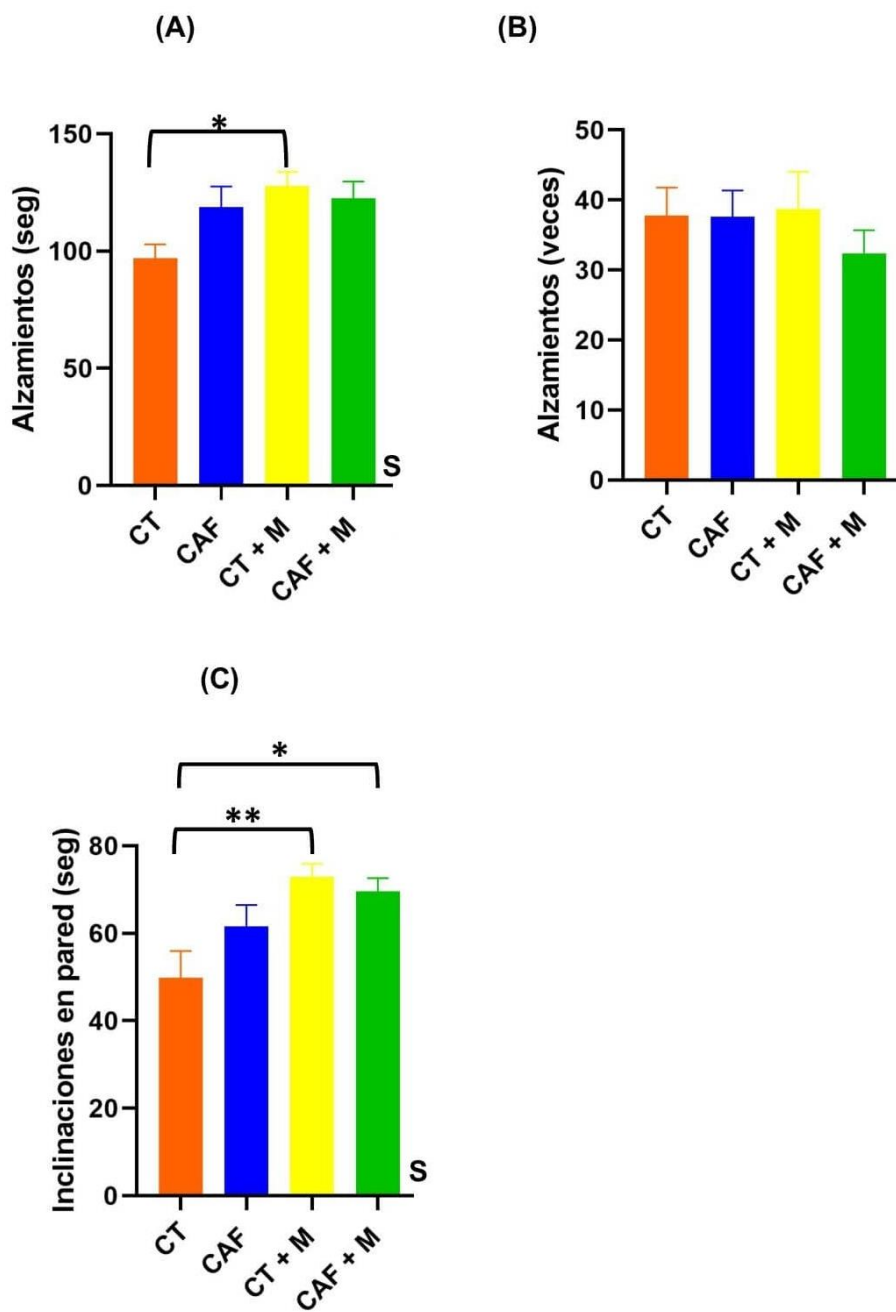


Figura 24. Duración de los alzamientos directos durante la prueba (A), número de veces de alzamientos (B) y duración de los inclinaciones en la pared de la arena (C). Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

Durante la prueba de CA se registraron los alzamientos entre cada grupo experimental (Figura 24). En relación con el comportamiento tipo ansiedad, las crías del grupo CT+M presentaron una mayor duración en los alzamientos en el aire (127.72 ± 6.0) en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Por otra parte, no se encontró diferencia en el número de alzamientos en todos los grupos experimentales. Las crías de los grupos CT+M y CAF+M, presentaron mayor duración en cuanto a las inclinaciones en la pared respecto al grupo control ($p < 0.01$, $p < 0.05$).

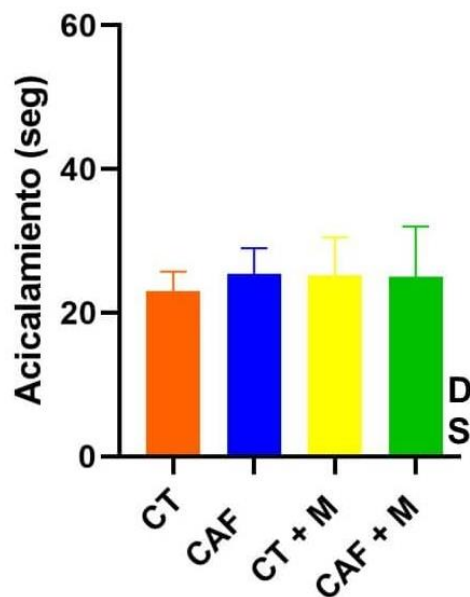


Figura 25. Duración de acicalamiento durante la prueba. Los resultados se expresan como media \pm MES. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

En la figura 25 se muestra la duración del acicalamiento durante la prueba de CA donde los resultados indican que no hubo ningún valor estadísticamente significativo entre los grupos experimentales, señalando que los resultados son muy parecidos entre sí.

11.2.6 Prueba de enterramiento de canicas

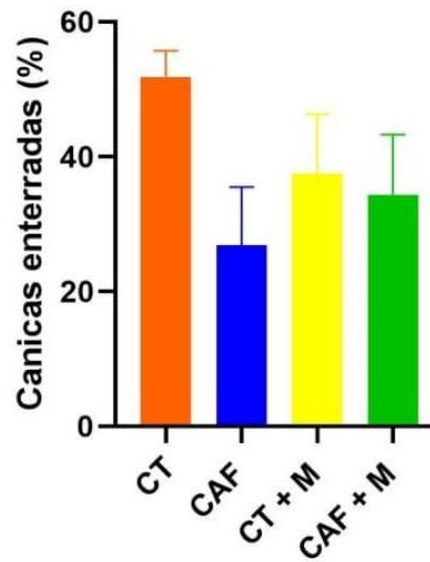


Figura 26. Porcentaje de canicas enterradas durante la prueba. Los resultados se expresan como media \pm M.E.S. CT = Control, CAF = Cafetería, CT+M = Control + donadores de metilo y CAF+M = Cafetería + donadores de metilo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores para analizar el efecto de la dieta materna (D), suplementación con donadores de metilo (S) o dieta materna x suplementación (DxS). La diferencia entre grupos fue determinada por prueba de Tukey como post hoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$ /grupo.

En la figura 26 se indica el número de canicas enterradas durante la prueba de enterramiento de canicas. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de crías respecto al porcentaje de canicas enterradas en esta prueba.

12. DISCUSIÓN

12.1 La dieta de cafetería y la suplementación con donadores de metilo ejercen un efecto sobre el peso y la ingesta

12.1.1 Hembras madres

La alta prevalencia de la obesidad materna y el consumo de una dieta de cafetería contribuyen a una serie de complicaciones en la salud, tanto para la madre como para la descendencia. En el presente estudio, la dieta de cafetería genera mayor ganancia de peso corporal, sin embargo, este efecto se ve modificado cuando se suplementa con donadores de metilo, induciendo una pérdida de peso, especialmente al final del periodo de lactancia. Es importante indicar que el grupo control suplementado con donadores de metilo también presentó una reducción en la ganancia de peso, lo que podría sugerir que este efecto ocurre con la suplementación, independientemente del tipo de dieta.

Por otra parte, se debe considerar que las madres suplementadas tuvieron una menor ingesta dietética durante el periodo de lactancia, lo que podría estar contribuyendo a la menor ganancia de peso reflejada en esta etapa. Esta investigación incluyó suplementos basados en donadores de metilo, en donde se incluye la betaína. Referente a lo anterior, estudios en animales han demostrado el efecto benéfico de la suplementación con betaína sobre la composición corporal, mientras que los resultados de estudios en humanos son controvertidos e inconsistentes. En este sentido, se ha demostrado que la suplementación con betaína oral, reduce el peso corporal y el IMC en comparación con participantes tratados con placebo (Grizales et al., 2018).

Sin embargo existen otros estudios que describen efectos diversos sobre el peso corporal, en base a esto, Jiao et al. (2016) encontraron que la dieta alta en grasa y alta en grasa + metilos afectan el peso corporal de las madres. En el modelo experimental se utilizaron ratones C57BL7/6 hembras a las cuales se les asignó cuatro tipos de dieta diferentes: 1) control, 2) alta en grasa, 3) control + metilos, y 4) alta en grasa + metilos. Las dietas se administraron por 1.5 semanas antes del

apareamiento y durante la gestación y la lactancia. Por cada kg de alimento se utilizaron las siguientes dosis de metilos: 18 mg de ácido fólico, 1.5 mg de vitamina B₁₂, 18 g de colina, 7.5 mg de metionina, 180 mg de zinc, 15 g de betaína y 0.3 g de genisteína. Los autores encontraron que luego de una semana de exposición a la dieta, las madres de dieta alta en grasa y alta en grasa + metilos tuvieron mayor peso corporal en comparación con el grupo control. Esto podría sugerir que una dieta alta en grasa promueve un fenotipo obesogénico a pesar de la adición de metilos en las madres.

Carlin et al. (2013) encontraron que una dieta alta en grasa puede tener un efecto sobre el peso corporal en madres. En el modelo experimental se utilizaron ratones C57BL/6 hembras las cuales fueron apareadas con ratones DBA/2J y se mantuvieron en dieta control antes del apareamiento. Luego del apareamiento, a las madres se les administró diferentes dietas: 1) control, 2) control + metilos, 3) alta en grasa y 4) alta en grasa + metilos. Los metilos utilizados por kg de alimento fueron: 15 g de colina, 15 g de betaína, 15 mg de ácido fólico, 1.5 mg de cobalamina, 7.5 g de metionina y 150 mg de zinc. Los autores encontraron que las madres que consumieron una dieta alta en grasa tuvieron mayor peso al día 14 y 17 posnatal en comparación con los demás grupos. Estos resultados nos indican que este tipo de dietas sí pueden influir en fenotipos de obesidad.

En nuestro modelo experimental se administró la dieta 3 semanas antes del apareamiento y durante la gestación y lactancia a diferencia de algunos de los artículos citados, sin embargo, las dietas son similares y los tipos y las dosis de los donadores de metilo son iguales a los estudios de Cordero et al. (2013). Las dosis de metilos son las mismas que se utilizaron en los primeros estudios sobre epigenética en animales como lo es el estudio de Waterland et al. (2008) donde se estudian los donadores de metilo para producir cambios epigenéticos en el locus *A^{vy}* como prevención transgeneracional de la amplificación de obesidad en ratones. En el caso de los artículos anteriormente citados, la suplementación con metilos no tuvo un efecto significativo en el peso en comparación con el grupo control, incluso adicionados a una dieta alta en grasa no tienen un efecto en la reducción de peso,

sino en el aumento de este de igual manera que la dieta alta en grasa sin suplementación como se observó en el estudio de Jiao et al. (2016). Esto nos sugiere que la dieta alta en grasa tiene un efecto más notorio en modular el peso de las madres.

12.1.2 Machos crías

Los resultados del presente estudio muestran que la dieta materna de cafetería suplementada con donadores de metilo no reduce la ganancia de peso en la descendencia al final del experimento en comparación con el grupo control. Respecto a la suplementación con donadores de metilo, varios autores han descrito efectos diversos de la suplementación con ácido fólico sobre el peso (Ly et al., 2011). Cho et al. (2013) encontró que la suplementación maternal con ácido fólico promueve una mayor ganancia de peso e ingesta de alimentos en crías macho comparado con un grupo control. En el modelo experimental utilizaron ratas Wistar hembras y las dividieron en dos grupos con dieta distinta que se les dio durante el embarazo y lactancia: 1) Dieta AIN-93G con dosis recomendada de ácido fólico de 2mg/kg (RV) y 2) Dieta con alta dosis de ácido fólico (HFol) que contiene 10 veces más ácido fólico que el recomendado (18mg/kg). Y al destete, a las crías de madres con dieta RV se les siguió dando esa dieta, por otro lado, a las crías de HFol se les dio dieta RV o dieta HFol. Se encontró que la dieta materna HFol se relacionó con mayor ingesta en crías macho, así como también mayor peso. Los autores sugieren que esto apoya la hipótesis de que la suplementación con folato puede expresar un fenotipo obesogénico en la descendencia debido a que encontraron una hipermetilación de POMC y 5-HTR2A (supresores del apetito) relacionado a una dieta materna alta en folato (Cho et al., 2013).

Ly et al. (2011) encontraron que una suplementación con ácido fólico en las madres altera el peso corporal de las crías. En el modelo experimental utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras, las dividieron en dos grupos y se les alimentó con una dieta diferente por tres semanas antes del apareamiento y durante la gestación y la lactancia. Las dietas eran: 1) control (2 mg de ácido fólico) y 2) suplementada (5 mg de ácido fólico). Al destete, las crías de madres con dieta control se dividieron

en dos grupos y se les alimentó con las mismas dos dietas a cada grupo y lo mismo sucedió con las crías de madres con dieta suplementada. Respecto al peso, la suplementación materna con ácido fólico se relacionó con un incremento en el peso corporal de las crías al destete en un 13% más que las crías de madres con dieta control. En nuestro estudio, de igual manera, se encontró que las crías de madres con dieta CT+M tuvieron un peso corporal elevado, pero no mayor al de las crías de dieta materna CT.

En contraste con lo encontrado en nuestro estudio, Sie et al. (2013) encontraron que la suplementación materna con ácido fólico disminuye el peso corporal en las crías. En este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras a las cuales durante tres semanas antes del apareamiento y durante la gestación y lactancia se les alimentó con dos dietas diferentes: 1) control (2mg de ácido fólico y 2) suplementada (5mg de ácido fólico). A las crías, luego del destete, se les alimentó con una dieta control o con una suplementada. Los autores encontraron que las crías de madres con dieta suplementada pesaron menos que las crías de madres con dieta control y no hubo efecto en la ingesta.

En nuestro modelo experimental empleamos diversos donadores de metilo en las dietas maternas, no solo ácido fólico sino también betaína, colina y vitamina B₁₂ durante el periodo pregestacional, gestacional y posnatal en las madres y no en las crías. Todos estos metilos y sus dosis se han utilizado previamente en estudios donde también analizan el efecto del comportamiento en la descendencia como los estudios de Cordero et al. (2013) y Carlin et al. (2013). Los donadores de metilos tienen un impacto en la ingesta y peso corporal de la descendencia, mayormente relacionados a un aumento en estos parámetros, aunque no es generalizado este efecto, ya que Sie et al. (2013) encontraron un resultado opuesto.

En nuestro proyecto encontramos que las crías de dietas con metilos tuvieron mayor ganancia de peso corporal al finalizar la semana 8, independientemente del tipo de dieta materna (control o dieta cafetería), esto puede deberse principalmente al ácido fólico, basado en Cho et al. (2013) respecto a cómo su ingesta en dosis elevadas puede desarrollar un fenotipo obesogénico. Nuestro estudio empleó 5.5

mg/kg de dieta, dosis menor a la indicada en este estudio (18 mg/kg), y mayor a la recomendada (2 mg/kg). Una respuesta a este efecto puede ser debido a la supresión de péptidos anorexigénicos que podrían ser marcadores de interés para análisis posteriores. Sin embargo, al observar el parámetro de eficiencia energética encontramos que la dieta materna de cafetería (CAF o CAF+M) se relaciona con un aumento de este valor, una hipótesis puede ser que aunque a las crías CAF pareciera que se les programó para que no presentaran hiperfagia o un elevado peso corporal al tener un valor de eficiencia energética más alto, en un futuro podría incrementarse la preferencia por el consumo de dietas hipercalóricas, en consecuencia habría cambios en el peso promoviendo un fenotipo obesogénico.

Por otra parte, nuestro estudio indica que las crías de madres cafetería tuvieron menor peso corporal y menor ingesta en comparación con el grupo control, en este sentido, Vithayatil et al. (2018) reportó que las crías cafetería presentaron menor peso al destete, este patrón se mantuvo hasta las 6 semanas de edad incluso cuando las crías fueron alimentadas con una dieta estándar en comparación con las crías de madres control. Los autores sugieren que una dieta obesogénica como la cafetería presenta deficiencias nutricionales, lo que afecta el crecimiento fetal de la descendencia y además el crecimiento posnatal de las crías mediante la exposición mediante la lactancia materna. Esta dieta tiende a ser alta en grasas y baja en proteínas, el cual es un nutriente fundamental para disminuir el riesgo de restricción en el crecimiento intrauterino. Una dieta de cafetería también contiene baja cantidad de micronutrientes los cuales son necesarios para el crecimiento fetal y desarrollo neurológico (Vithayathil et al., 2018). Un estudio similar fue el de George et al. (2019). que reportó una disminución en el peso al nacer y en la etapa posnatal en crías macho y hembra de madres alimentadas con una dieta cafetería durante el embarazo y la lactancia en comparación con el grupo control. Probablemente por una incapacidad en la recuperación del menor peso al nacer.

12.2 La dieta materna de cafetería genera un déficit social en la descendencia

Teixeira et al. (2020) encontraron que una dieta de cafetería puede influir en la sociabilidad. En su modelo experimental utilizaron ratas Wistar hembras a las cuales durante el periodo de apareamiento y gestación se les alimentó con dieta estándar. Durante la lactancia, a las madres se les dividió en dos grupos con diferente dieta: 1) control y 2) cafetería. Al día posnatal 21, a las crías se les destetó y a los machos se les colocó en jaulas recibiendo la misma dieta que la madre hasta la adultez. A las crías se les realizaron diferentes pruebas de comportamiento y 30 minutos antes de cada prueba se les administraba 1.0 ml/kg^{-1} de solución salina o risperidona para probar el efecto que ejercía el fármaco en la conducta del animal. Enfocándonos en el grupo de crías cafetería + solución salina (crías sin efecto del fármaco, sólo efecto de la dieta) se encontró que presentaban menor comportamiento social, específicamente menor olfateo anogenital hacia otro ratón extraño, y también presentaron menor interacción social en comparación con el grupo cafetería + risperidona y control + solución salina en una prueba de interacción social entre dos ratones del mismo sexo, pero sin parentesco (extraños). Esto indica que la dieta por sí sola puede tener un efecto significativo en la conducta social del animal.

Kang et al. (2014) encontraron de manera similar que la dieta influye en la sociabilidad. En el modelo experimental utilizaron ratones hembra C57BL/6 las cuales se dividieron en dos grupos con diferente dieta: 1) control (CT) y 2) alta en grasa (HFD). La dieta se administró 6 semanas antes del apareamiento y durante la gestación, luego durante la lactancia, a un grupo de hembras de cada grupo se les administró la dieta opuesta, quedan en 4 grupos: CT/CT, HFD/HFD, CT/HFD, HFD/CT. A las crías se les alimentó con dieta control luego del destete, y posteriormente a la semana 6, se les realizaron diversas pruebas de comportamiento. En el estudio se encontró que las crías hembra de madres con dieta HFD/HFD pasaron menor tiempo interactuando con el ratón extraño en comparación con crías CT/CT, pero esto no sucedió en las crías macho. También encontraron que la crías hembra de madres HFD/CT tuvieron un resultado similar

al grupo CT/CT en un score de interacción social en la prueba de sociabilidad de 3-cámaras. Los autores concluyen que una dieta materna obesogénica puede inducir un estado proinflamatorio en madres similar al modelo MIA y además se ven efectos negativos a nivel cerebral en las crías más sintomáticas. Unos de estos efectos se observaron en crías hembra de madres HFD/HFD las cuales presentaron mayores niveles de IL-1 β y TNF α a nivel cerebral, además tener una mayor expresión de *Iba1* (un marcador de microglía) en la amígdala, la cual está relacionada con comportamiento social y de ansiedad.

Buffington et al. (2016) encontraron igualmente que la dieta alta en grasa materna puede afectar el comportamiento social de la descendencia. Para el modelo experimental utilizaron ratones C57BL/6 hembras a las cuales se les dio una dieta control (CT) o una dieta alta en grasa (HFD) durante 8 semanas antes del apareamiento, gestación y lactancia, al momento del destete a todas las crías se les alimentó con dieta control y a las 4 semanas de vida se les realizaron diferentes pruebas de comportamiento. Los autores encontraron que las crías de madres con dieta HFD tuvieron menor duración de la interacción social y de contactos sociales, además de no mostrar preferencia de novedad social en la prueba de sociabilidad de 3-cámaras. Uno de los factores involucrados en un marcado déficit social en este grupo de crías es la microbiota, los autores detectaron una diversidad reducida y una diferencia en las comunidades microbianas intestinales en comparación con las crías de madre con dieta control. Aunado a esto, también encontraron que si colocaban a las crías HFD con crías CT luego del destete, éstas presentaban una interacción recíproca social normal debido a que los ratones presentan coprofagia como comportamiento habitual y por consiguiente al ingerir las heces de ratones CT, los ratones HFD mejoraron la sintomatología y además se corrigieron las alteraciones en las comunidades microbianas, un claro ejemplo de la posible eficacia del trasplante fecal para mejorar condiciones de salud y la importancia del eje intestino-microbiota-cerebro.

Veniaminova et al. (2017) hallaron también un efecto de alto impacto en la conducta relacionado al consumo de una dieta obesogénica. En el modelo experimental se utilizaron ratones hembra C57BL/6 a las cuales se les dio una dieta control o una dieta Western alta en grasa y carbohidratos por 3 semanas. A un grupo de estos ratones se les sometió a pruebas de sociabilidad directamente y no a las crías, en este estudio no se analiza una programación fetal. Las hembras que consumieron la dieta Western presentaron mayor número de comportamiento “solitarios” como menor duración de reunirse en grupo y mayor duración de sentarse en solitario en la prueba de interacción social y comportamiento solitario entre un grupo de ratones del mismo grupo. Lo cual concluye en cómo esta dieta se relaciona con un comportamiento de evasión social.

En nuestro modelo, la dieta se administró durante el período pregestacional, gestacional y posnatal (lactancia) en las madres ratones solamente y no durante la vida posterior de las crías o interrumpiendo uno de los periodos antes mencionados. Independientemente del período en que se administran las dietas, se puede ejercer un notorio efecto negativo en la conducta social, aunque los mecanismos subyacentes no han sido elucidados aún. Como lo comenta Kang et al. (2014) y Maldonado et al. (2019), una dieta materna obesogénica, como la dieta de cafetería o la dieta alta en grasa, puede ser altamente comparable con los modelos de autismo de MIA en donde se muestra un estado proinflamatorio importante en la madre y, por consiguiente, un efecto negativo en la sintomatología de la descendencia y en este caso, incidir en la conducta social.

También se ha encontrado que una dieta materna alta en grasa se relaciona con cambios en el epigenoma, un ejemplo de esto son las modificaciones en la estructura de la cromatina en la descendencia como la alteración en la expresión de la desacetilasa de histona 1 (HDAC1), la cual, en su forma codificada a proteína, se encontraba depletada en crías de madres con una dieta alta en grasa (Aagaard-Tillery et al., 2008).

Encontramos que las crías de madres CAF tuvieron menor duración de la sociabilidad con un ratón extraño, menor duración en la cámara del ratón extraño y mayor interacción con el objeto inanimado en comparación con el grupo CT en la prueba de sociabilidad de 3-cámaras. También indicamos que las crías CAF olfatearon menor número de veces al ratón extraño similar a lo encontrado en los estudios previamente citados. Sin embargo, pudimos encontrar que las crías CAF+M presentaron una preferencia por el objeto inanimado en ciertos parámetros como mayor duración de la interacción con el objeto inanimado y mayor duración y número de veces de olfateos al objeto en comparación con el grupo CT. Esto sugiere que, si bien la dieta de cafetería por sí sola o suplementada puede tener un efecto negativo significativo en la sociabilidad, su efecto es más notorio cuando se administra sola, como se analiza en el siguiente apartado, la suplementación con donadores de metilo puede mejorar la sociabilidad.

12.3 La suplementación materna con donadores de metilo frente a una dieta de cafetería normaliza la interacción social en la descendencia

Actualmente no existe algún estudio que analice la suplementación de donadores de metilo frente a una dieta de cafetería y su relación con el comportamiento social, no obstante, Orenbuch et al. (2019) encontraron que una suplementación materna con donadores de metilo puede proteger a la descendencia de presentar comportamientos similares a autismo. Para el modelo experimental utilizaron ratones Balb/cAnNCrIBR wild type (WT) y ratones knock-out *Mthfr* hembras. Se dividieron en 5 grupos: grupo 1) crías WT nacidas de madres WT con dieta control. Grupo 2) crías WT nacidas de madres *Mthfr*+/- con dieta control, grupo 3) crías *Mthfr*+/- nacidas de madres *Mthfr*+/- con dieta control. Los grupos 4 y 5 fueron similares al grupo 3 excepto que las dietas estaban enriquecidas con donadores de metilo. Al grupo 4 se le dio la dieta durante el periodo pregestacional y gestacional y al grupo 5 se le dio dieta control hasta la gestación y dieta enriquecida durante la lactancia. El enriquecimiento consistía en 9mg/ml de ácido

fólico, 2% de betaína y 2% de colina disueltos en el agua del biberón. A los 3 meses a todas las crías se les sometió a diversas pruebas de comportamiento. Los autores encontraron que las crías de madres *Mthfr*^{+/-} que fueron alimentadas con dieta prenatal con donadores de metilo presentaron mayor número de comportamientos sociales medidos por la prueba de sociabilidad de 3-cámaras en comparación con los grupos *Mthfr*^{+/-} con dieta control.

Zhang et al. (2019) también encontraron un efecto positivo de la suplementación de ácido fólico en sociabilidad en un modelo de autismo. En su modelo experimental utilizaron ratones BTBR o C57BL/6 hembras. A un grupo de ratones BTBR crías macho se les administró por vía oral ácido fólico a una concentración de 0.2 mg/kg/día disuelto en agua desionizada por 21 días consecutivos a partir del día 14 posnatal. Luego de esto, se les asignó a diferentes pruebas de comportamiento de manera aleatoria durante el día posnatal 35 a 42. Los autores encontraron que las crías de madres BTBR presentaron una reducción en la duración de interacciones sociales en comparación con las crías C57BL/6. Sin embargo, las crías BTBR a las que se les administró ácido fólico posnatalmente, presentaron una mayor duración de interacción social con el ratón extraño y mayor duración en la jaula donde se encontraba este animal. Además de esto encontraron que el tratamiento con ácido fólico disminuyó los niveles de marcadores de inflamación en los ratones BTBR (GFAP, Iba-1 y TNF α , IL-1 β , IL-18 e IL-6) en el hipocampo y atenuó el estrés oxidativo cerebral al regular a la alza las enzimas GSH, GSH-PX y SOD en comparación con crías BTBR sin tratamiento. Estos resultados sugieren que la suplementación con esta vitamina puede mejorar la sociabilidad incluso en un modelo genético de autismo.

Huang et al. (2019) encontraron que otro donador de grupos metilo, la betaína, también puede influir en la atenuación de efectos en el comportamiento en un modelo de autismo. En el modelo experimental utilizaron ratones ICR hembras bajo una dieta control a las cuales, luego del inicio de la gestación durante el día embrionario 12.5 se les administró 500 mg/kg de ácido valproico (AV) o solución salina. A las crías se les siguió dando la dieta control durante la vida posterior hasta

la semana 8 de vida donde se seleccionó un subgrupo de ratones de cada grupo de crías de diferente tratamiento materno a las que se les administró betaína a distintas concentraciones mediante una inyección, las dosis fueron: 0, 40, 80 y 160 $\mu\text{mol/kg}$ de peso. Luego fueron sometidos a diferentes pruebas de comportamiento. Los autores encontraron que las crías AV con administración de betaína (80 y 160 $\mu\text{mol/kg}$) atenuó la reducción en la duración de olfateo a un ratón extraño que presentaban las crías AV sin administración de betaína. También los ratones tratados mostraron una atenuación en el déficit social que presentaron los ratones AV no tratados, específicamente pasaron mayor tiempo interactuando con el ratón extraño que con el objeto inanimado en la prueba de sociabilidad de 3-cámaras.

Langley et al. (2015) también hallaron la importancia de la suplementación de un donador de metilo (colina) en la sociabilidad en un modelo de autismo. En el modelo experimental utilizaron ratones BTBR T + Itpr3tf/J y C57BL/6 hembras. Los ratones de cada cepa se dividieron en dos grupos con dieta control o con dieta suplementada con colina. La dieta control contenía 8 mmol/kg de colina y la dieta suplementada 36 mmol/kg y se les administró desde el inicio del apareamiento hasta la lactancia (hasta el día posnatal 21). A las crías se les destetó y se les asignó una dieta control y al día posnatal 33-36 (adolescencia) se les sometió a diferentes pruebas de comportamiento. Los autores encontraron que las crías de madres BTBR control pasaron más tiempo en la cámara del objeto inanimado en comparación con la cámara del ratón extraño, también tuvieron una corta duración interactuando con el ratón extraño, en cambio los ratones crías de madres BTBR suplementadas con colina tuvieron resultados similares a los del grupo control C57BL/6 caracterizado por mayor sociabilidad y duración en la cámara del ratón extraño, mostrando que la suplementación con colina normaliza el déficit social.

Los estudios antes citados en este apartado nos indican que la suplementación con un solo donador de metilo puede mejorar la sociabilidad en la descendencia de madres como lo muestra Orenbuch et al. (2019) y Zhang et al. (2019) con el ácido fólico, Huang et al. (2019) con la betaína y Langley et al. (2015) con la colina, los cuales son metilos que utilizamos en las dietas experimentales,

aparte de la cobalamina, de la cual aún no hay información sobre la influencia en la sociabilidad, pero hipotetizamos que de igual manera podría mejorar la conducta social debido que también es una parte clave dentro del ciclo de un carbono. Estudios genómicos han descubierto variantes de un solo nucleótido y variantes en número de copias en ~100 genes y loci que están relacionados al autismo y la mayoría caen en dos clases funcionales: 1) genes que codifican proteínas directamente implicadas en el desarrollo y función de sinapsis y 2) genes que codifican enzimas o proteínas de regulación de la cromatina y maquinaria epigenética (De Rubeis et al., 2014; Tremblay & Jiang, 2019).

Diversas estructuras cerebrales han sido identificadas por su papel en la conducta social y algunas de ellas se han relacionado en el comportamiento en autismo como la corteza orbitofrontal, amígdala, córtex de cíngulo anterior y surco temporal superior, entre otras (Gordillo et al., 2019) y las cuales son de interés para estudiar en un futuro. En cuanto a los resultados que obtuvimos en nuestro modelo experimental encontramos que la suplementación materna con donadores de metilo promovió una normalización de la sociabilidad en la descendencia ante la dieta CAF, en comparación con las crías de madres con dieta CAF sin suplementar que presentaron un déficit social significativo.

12.4 La suplementación materna con donadores de metilo promueve un incremento en la ansiedad en la descendencia

Ryan et al. (2018) encontraron que una dieta paterna rica en donadores de metilo puede alterar la cognición en las crías macho. En el modelo experimental utilizaron ratones C57BL/6 machos los cuales, luego de la aclimatación, fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: 1) grupo con dieta control y 2) grupo con dieta suplementada con donadores de metilo. La dieta suplementada contenía por cada kg: 7.5 g de metionina, 15 g de colina, 15 g de betaína, 15 mg de ácido fólico, 1.5 mg de vitamina B₁₂ y 150 mg de zinc. Luego de 6 semanas de alimentación con las dietas, a los machos se les apareó con ratones hembra 129S6/SvEv y a las crías de estos grupos se les denominó F1. Las crías en edad adulta fueron sometidas a

diferentes pruebas de comportamiento. Los autores encontraron que las crías F1 de dieta suplementada no presentaron una diferencia estadísticamente significativa en la distancia recorrida, alzamientos y duración en la zona central en comparación con crías control. Mostrando que la suplementación no tuvo efecto en estos parámetros medidos en la prueba de campo abierto. Sin embargo, un efecto importante que se encontró en crías con dieta paterna suplementada fue una disminución en el aprendizaje espacial caracterizada por mayor ocupación y valores de cruzamiento entre cuadrantes en la prueba del laberinto de agua de Morris. También se encontró que las crías de dieta paterna suplementada tenían alteraciones en la expresión de genes en hipocampo, una región del cerebro encargada del aprendizaje y la memoria, específicamente de *Mat2* encargado de catalizar la producción de SAM. Una reducción compensatoria de su expresión podría tener como finalidad reducir la biosíntesis de SAM bajo condiciones de disponibilidad aumentada de donadores de metilo e influir en los patrones de metilación hipocampal. Además, encontraron que un exceso de donadores de metilo puede producir alteraciones sinápticas.

Barua et al. (2014) encontraron que un incremento de la ingesta materna de ácido fólico podía modificar el comportamiento de la descendencia. En el modelo experimental utilizaron ratones C57BL7/6 hembras a las cuales a partir de 1 semana antes del apareamiento se les alimentó con diferentes dietas. El grupo control consumió una dieta estándar que contenía 0.4 mg/kg de dieta de ácido fólico (FR) mientras que el grupo suplementado consumió una dieta estándar adicionada con 4 mg/kg de ácido fólico (FA). La dosis fue asignada en base a la recomendación de ingesta 10 veces mayor de ácido fólico durante el embarazo en humanos. Al día posnatal 2, 4 y 6, las crías se sometieron a una prueba de vocalizaciones ultrasónicas y posteriormente al mes 2 y 7 de edad se les realizaron otras pruebas de comportamiento. Las crías siguieron consumiendo la misma dieta que sus respectivas madres. Los autores encontraron que las crías FA tuvieron una mayor duración de llamado, notando que se fue incrementando con el paso de los días en la prueba de vocalizaciones ultrasónicas. Crías macho FA también mostraron un aumento en la hiperactividad al inicio de la prueba de campo abierto y también recorrieron mayor distancia que las crías FR. Estos cambios en el comportamiento

pueden deberse a la modificación en la expresión de diferentes genes implicados en la liberación de neurotransmisores y en la plasticidad sináptica. Por ejemplo, el gen *Htr4* cuya expresión se encontraba regulada a la baja en ratones crías FA y el cual se ha relacionado al desarrollo de trastornos neurológicos. Los autores concluyen que el ácido fólico ha mostrado beneficios en diversos estudios, pero es muy importante regular la dosis y el tiempo en que se suplementa para no generar efectos adversos.

Yadon et al. (2019) encontraron que una dieta alta en donadores de metilo puede modular el comportamiento. Para el modelo experimental utilizaron ratones de playa "*Peromyscus polinotus*" hembras y machos a los cuales mantuvieron en pareja para el apareamiento y les administraron una dieta control estándar (0 g de betaína, 2.5 g de colina, 0.0027 mg de ácido fólico y 0.051 de cobalamina por cada kg de dieta) o una dieta suplementada con metilos (5 g de betaína, 7.97 g de colina, 0.0043 mg de ácido fólico y 0.53 mg de cobalamina por kg de dieta). Una vez realizado el destete, a las crías se les mantuvo en la misma dieta que sus padres hasta los 4 meses de edad. Los autores no encontraron un efecto directo en el comportamiento tipo ansiedad en crías de padres con dieta suplementada. Sin embargo, encontraron altos niveles de cortisol en estas crías macho, lo cual se ha relacionado a comportamientos tipo ansiedad, comportamientos repetitivos y disminución de sociabilidad.

La microbiota intestinal también puede ser un factor que pudiera estar modulando el comportamiento tipo ansiedad como se ha encontrado en el estudio de Miousse et al. (2017) donde la suplementación con metionina alteró la composición de la microbiota. Actualmente no hay un estudio que analice el efecto de la suplementación materna con donadores de metilo a una dieta control o cafetería y su relación con indicadores de ansiedad en pruebas de comportamiento. Nuestro proyecto es el primero en encontrar una relación entre algunos parámetros como alzamientos e inclinaciones en pared en el contexto de comportamiento relacionado a la ansiedad y exploración, y la suplementación con donadores de metilo. Al igual que Ryan et al. (2018), no encontramos diferencia en la distancia

recorrida y la duración en la zona central de la arena en la prueba de campo abierto en ratones con suplementación materna con donadores de metilo. Aunque nosotros no evaluamos el aprendizaje espacial o memoria en nuestro modelo, este estudio nos indica que los donadores de metilo pueden tener un efecto adverso a nivel cerebral en las crías dependiendo de la dosis, sin embargo, este estudio muestra los efectos de la suplementación en los padres y no en las madres, razón por la cual pudieron haber encontrado otros resultados distintos a los que obtuvimos.

En cuanto al estudio de Barua et al. (2014) se encontró que los ratones crías con suplementación materna y posnatal con alta dosis de ácido fólico tuvieron una mayor locomoción en la prueba de campo abierto, nosotros no encontramos un efecto significativo en este parámetro en ratones CT+M o CAF+M. Los autores también encontraron que estas crías con altas dosis de ácido fólico presentaron una mayor duración de las vocalizaciones ultrasónicas, la cual se ha relacionado con ansiedad en las crías que se traduce con un mayor número/intensidad de los llamados ante la separación de la madre en días posnatales tempranos (Schwartz & Wöhr, 2012).

En nuestro modelo encontramos otros parámetros concernientes a la ansiedad, los alzamientos, siendo las crías CT+M las que tuvieron un mayor número de éstos, y las inclinaciones a la pared, siendo las crías CT+M y CAF+M las que tuvieron una mayor duración en comparación con los demás grupos. La amígdala y el hipocampo son regiones cerebrales que están involucradas en el comportamiento de ansiedad y se relacionan con diversos trastornos neuropsiquiátricos (Vonderwalde, 2019). Nosotros hipotetizamos que la suplementación con donadores de metilo ejerció una disminución en la expresión de DNMT en estas regiones y, por consiguiente, una alteración en el comportamiento.

Algunas de las limitaciones de nuestro modelo es la cantidad de sujetos de estudio empleados en cada grupo, principalmente en madres, lo cual da mayor validez estadística. Otra limitación es el empleo de solamente tres pruebas de comportamiento para sustentar un modelo similar al autismo.

13. CONCLUSIONES

1. La dieta de cafetería promueve una disminución en el peso corporal y en la ingesta de alimentos en la descendencia, lo que sugiere que esta dieta no afectó la programación de un fenotipo obesogénico durante la etapa temprana.
2. La dieta de cafetería provocó un aumento en la eficiencia energética de la descendencia, lo que podría sugerir alteraciones en cuanto a la composición corporal en etapas tardías al alterarse el metabolismo basal.
3. La dieta de cafetería materna por sí sola o suplementada ejerce un efecto negativo en la sociabilidad de la descendencia.
4. La suplementación materna con donadores de metilo promueve una normalización de la sociabilidad en la descendencia ante una dieta de cafetería.
5. La suplementación materna con donadores de metilo promueve un comportamiento tipo ansiedad en crías macho, lo cual sugiere establecer una mejor regulación en la dosis y el tiempo de exposición a dicha suplementación.

14. REFERENCIAS

- Aagaard-Tillery, K. M., Grove, K., Bishop, J., Ke, X., Fu, Q., McKnight, R., & Lane, R. H. (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: Maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *Journal of Molecular Endocrinology*, *41*(1–2). <https://doi.org/10.1677/JME-08-0025>
- Akyol, A., McMullen, S., & Langley-Evans, S. C. (2012). Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. *British Journal of Nutrition*, *107*(7), 964–978. [https://doi.org/DOI: 10.1017/S0007114511003916](https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114511003916)
- American Psychiatric Association. (2013). American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition. In *American Psychiatric Association*. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- 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: JoVE*, *82*. <https://doi.org/10.3791/50978>
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (2013). Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a british twin study. In *The Science of Mental Health: Volume 2: Autism*.
- Barker, D. J. P. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. In *British Medical Journal* (Vol. 301, Issue 6761). <https://doi.org/10.1136/bmj.301.6761.1111>
- Barua, S., Chadman, K. K., Kuizon, S., Buenaventura, D., Stapley, N. W., Ruocco, F., Begum, U., Guariglia, S. R., Brown, W. T., & Junaid, M. A. (2014). Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. *PLoS ONE*, *9*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101674>
- Bilder, D. A., Bakian, A. V., Viskochil, J., Clark, E. A. S., Botts, E. L., Smith, K. R.,

- Pimentel, R., McMahon, W. M., & Coon, H. (2013). Maternal prenatal weight gain and autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 132(5). <https://doi.org/10.1542/peds.2013-1188>
- Bolton, J. L., & Bilbo, S. D. (2014). Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 307–320. <https://doi.org/10.4090/juee.2008.v2n2.033040>
- Bromley, R. L., Mawer, G., Clayton-Smith, J., & Baker, G. A. (2008). Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology*, 71(23). <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000339399.64213.1a>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
- Careaga, M., Murai, T., & Bauman, M. D. (2017). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. In *Biological Psychiatry* (Vol. 81, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.020>
- Carlin, J. L., George, R., & Reyes, T. M. (2013). Methyl Donor Supplementation Blocks the Adverse Effects of Maternal High Fat Diet on Offspring Physiology. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063549>
- Catalano, P. M., & Shankar, K. (2017). Obesity and pregnancy: Mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ (Online)*, 356, 1–21. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1>
- Cervantes Ramírez, D. L., Haro Acosta, M. E., Ayala Figueroa, R. I., Haro Estrada, I., & Fausto Pérez, J. A. (2019). Prevalencia de obesidad y ganancia de peso en mujeres embarazadas. *Atención Familiar*, 26(2). <https://doi.org/10.22201/facmed.14058871p.2019.2.68824>

- Chen, J. A., Peñagarikano, O., Belgard, T. G., Swarup, V., & Geschwind, D. H. (2015). The emerging picture of autism spectrum disorder: Genetics and pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *10*, 111–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040405>
- Chen, Q., Sjölander, A., Långström, N., Rodriguez, A., Serlachius, E., D'Onofrio, B. M., Lichtenstein, P., & Larsson, H. (2014). Maternal pre-pregnancy body mass index and offspring attention deficit hyperactivity disorder: A population-based cohort study using a sibling-comparison design. *International Journal of Epidemiology*, *43*(1). <https://doi.org/10.1093/ije/dyt152>
- Cho, C. E., Sánchez-Hernández, D., Reza-López, S. A., Huot, P. S. P., Kim, Y. I., & Anderson, G. H. (2013). High folate gestational and post-weaning diets alter hypothalamic feeding pathways by DNA methylation in Wistar rat offspring. *Epigenetics*, *8*(7), 710–719. <https://doi.org/10.4161/epi.24948>
- Christensen, D. L., Braun, K. V. N., Baio, J., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Kurzius-Spencer, M., Lee, L.-C., Pettygrove, S., Robinson, C., Schulz, E., Wells, C., Wingate, M. S., Zahorodny, W., & Yeargin-Allsopp, M. (2018). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years. *MMWR. Surveillance Summaries*, *65*(13), 1–23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6513a1>
- Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y., & Sinclair, K. D. (2019). One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annual Review of Animal Biosciences*, *7*(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115206>
- Cordero, P., Milagro, F. I., Campion, J., & Martinez, J. A. (2013). Maternal methyl donors supplementation during lactation prevents the hyperhomocysteinemia induced by a high-fat-sucrose intake by Dams. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(12), 24422–24437. <https://doi.org/10.3390/ijms141224422>
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E.,

- Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S. C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., ... Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, *515*(7526). <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- Dinan, T. G., Stilling, R. M., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2015). Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. *Journal of Psychiatric Research*, *63*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.02.021>
- Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. In *Cell Metabolism* (Vol. 25, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. In *Science* (Vol. 353, Issue 6301). <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
- Fewtrell, M. S., Haschke, F., & Prescott, S. L. (2016). Preventive Aspects of Early Nutrition. *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series. Karger AG Basel.*, *85*, 169–172. <https://doi.org/10.1159/000439484>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Fox, J. T., & Stover, P. J. (2008). Chapter 1 Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 79). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00401-9)
- Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 71, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
- Galán-López, I., Lascarez-Martínez, S., Gómez-Tello, M., & Galicia-Alvarado, M. (2017). Abordaje integral en los trastornos del neurodesarrollo. *Revista*

Hospitalaria Juárez de México, 84(1), 19–25.

Galgani, J., & Ravussin, E. (2008). Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. In *International Journal of Obesity* (Vol. 32, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.246>

Gao, J., Cahill, C. M., Huang, X., Roffman, J. L., Lamon-Fava, S., Fava, M., Mischoulon, D., & Rogers, J. T. (2018). S-Adenosyl Methionine and Transmethylation Pathways in Neuropsychiatric Diseases Throughout Life. *Neurotherapeutics*, 15(1), 156–175. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0593-0>

Gordillo, F., Mestas, L., Pérez, M., & Arana, J. (2019). EL CEREBRO SOCIAL EN EL AUTISMO. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*, 22(3).

Grizales, A. M., Patti, M. E., Lin, A. P., Beckman, J. A., Sahni, V. A., Cloutier, E., Fowler, K. M., Dreyfuss, J. M., Pan, H., Kozuka, C., Lee, A., Basu, R., Pober, D. M., Gerszten, R. E., & Goldfine, A. B. (2018). Metabolic effects of betaine: A randomized clinical trial of betaine supplementation in prediabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 103(8), 3038–3049. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00507>

Grobe, J. L. (2017). Comprehensive assessments of energy balance in mice. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1614). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7030-8_10

Hales, C. N., & Barker, D. J. P. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. In *Diabetologia* (Vol. 35, Issue 7). <https://doi.org/10.1007/BF00400248>

Hernández, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., Gómez, L. M., Gaona, E., Romero, M., Méndez, I., Saturno, P., Villalpando, S., Gutiérrez, J., Ávila, M., Mauricio, E., Martínez, J., & García, D. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016*. 2016. <https://doi.org/10.21149/8593>

Hernández, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., Gómez, L. M., Gaona, E.,

- Romero, M., Méndez, I., Saturno, P., Villalpando, S., Gutiérrez, J., Ávila, M., Mauricio, E., Martínez, J., & García, D. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018*.
- Higa, T. S., Spinola, A. V., Fonseca-Alaniz, M. H., & Anna Evangelista, F. S. (2014). Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 6(1).
- Hjort, L., Martino, D., Grunnet, L. G., Naeem, H., Maksimovic, J., Olsson, A. H., Zhang, C., Ling, C., Olsen, S. F., Saffery, R., & Vaag, A. A. (2018). Gestational diabetes and maternal obesity are associated with epigenome-wide methylation changes in children. *JCI Insight*, 3(17). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122572>
- Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, 33(7), 673–689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>.The
- Huang, F., Chen, X., Jiang, X., Niu, J., Cui, C., Chen, Z., & Sun, J. (2019). Betaine ameliorates prenatal valproic-acid-induced autism-like behavioral abnormalities in mice by promoting homocysteine metabolism. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(6). <https://doi.org/10.1111/pcn.12833>
- Hulbert, S. W., & Jiang, Y. H. (2016). Monogenic mouse models of autism spectrum disorders: Common mechanisms and missing links. In *Neuroscience* (Vol. 321). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.040>
- Iyengar, N. M., Gucalp, A., Dannenberg, A. J., & Hudis, C. A. (2016). Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. *Journal of Clinical Oncology*, 34(35). <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4283>
- Jiao, F., Yan, X., Yu, Y., Zhu, X., Ma, Y., Yue, Z., Ou, H., & Yan, Z. (2016). Protective effects of maternal methyl donor supplementation on adult offspring of high fat diet-fed dams. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.04.005>

- Johnson, S. A., Javurek, A. B., Painter, M. S., Murphy, C. R., Conard, C. M., Gant, K. L., Howald, E. C., Ellersieck, M. R., Wiedmeyer, C. E., Vieira-Potter, V. J., & Rosenfeld, C. S. (2017). Effects of a maternal high-fat diet on offspring behavioral and metabolic parameters in a rodent model. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(1), 75–88. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000490>
- Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., & Woodgett, J. R. (2010). Assessment of social interaction behaviors. In *Journal of Visualized Experiments* (Issue 48). <https://doi.org/10.3791/2473>
- Kang, S. S., Kurti, A., Fair, D. A., & Fryer, J. D. (2014). Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0156-9>
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217–250.
- Kawai, M., Minabe, Y., Takagai, S., Ogai, M., Matsumoto, H., Mori, N., & Takeji, N. (2004). Poor maternal care and high maternal body mass index in pregnancy as a risk factor for schizophrenia in offspring. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 110(4). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2004.00380.x>
- Kim, H., Lim, C. S., & Kaang, B. K. (2016). Neuronal mechanisms and circuits underlying repetitive behaviors in mouse models of autism spectrum disorder. In *Behavioral and Brain Functions* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12993-016-0087-y>
- Kim, K. C., Gonzales, E. L., Lázaro, M. T., Choi, C. S., Bahn, G. H., Yoo, H. J., & Shin, C. Y. (2016). Clinical and neurobiological relevance of current animal models of autism spectrum disorders. *Biomolecules and Therapeutics*, 24(3), 207–243. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.061>
- Kim, S., Kim, H., Yim, Y. S., Ha, S., Atarashi, K., Tan, T. G., Longman, R. S., Honda, K., Littman, D. R., Choi, G. B., & Huh, J. R. (2017). Maternal gut bacteria

- promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*, 549(7673). <https://doi.org/10.1038/nature23910>
- Kinlen, D., Cody, D., & O'Shea, D. (2018). Complications of obesity. In *QJM* (Vol. 111, Issue 7). <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcx152>
- 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. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187>
- Kurth, F., Narr, K. L., Woods, R. P., Neill, J. O., Alger, J. R., Caplan, R., Mccracken, J. T., Toga, A. W., & Levitt, J. G. (2011). Diminished grey matter within the hypothalamus in autism disorder: a potential link to hormonal effects? *Biological Psychiatry*, 70(3), 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.03.026>. Diminished
- Lammert, C. R., & Lukens, J. R. (2019). Modeling autism-related disorders in mice with maternal immune activation (MIA). In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1960). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9167-9_20
- Langley, E. A., Krykbaeva, M., Blusztajn, J. K., & Mellott, T. J. (2015). High maternal choline consumption during pregnancy and nursing alleviates deficits in social interaction and improves anxiety-like behaviors in the BTBR T+Itpr3tf/J mouse model of autism. *Behavioural Brain Research*, 278, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.043>
- Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2).
- Li, Y. (2018). Epigenetic mechanisms link maternal diets and gut microbiome to obesity in the offspring. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00342>
- Lim, C., & Mahmood, T. (2018). Obesity in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 28(2), 53–56.

<https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2017.11.003>

Lobstein, T., Brinsden, H., Gill, T., Kumanyika, S., & Swinburn, B. (2017). Comment: obesity as a disease – some implications for the World Obesity Federation's advocacy and public health activities. In *Obesity Reviews* (Vol. 18, Issue 7). <https://doi.org/10.1111/obr.12554>

Ly, A., Lee, H., Chen, J., Sie, K. K. Y., Renlund, R., Medline, A., Sohn, K. J., Croxford, R., Thompson, L. U., & Kim, Y. I. (2011). Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. *Cancer Research*, 71(3), 988–997. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2379>

Mahmood, L. (2014). The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *Journal of Health Research and Reviews*, 1, 5.

Maldonado-Ruiz, R., Garza-Ocañas, L., & Camacho, A. (2019). Inflammatory domains modulate autism spectrum disorder susceptibility during maternal nutritional programming. In *Neurochemistry International* (Vol. 126). <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.009>

Martorell, R., Stein, A. D., & Schroeder, D. G. (2001). Early Nutrition and Later Adiposity. *The Journal of Nutrition*, 131(3). <https://doi.org/10.1093/jn/131.3.874s>

Miousse, I. R., Pathak, R., Garg, S., Skinner, C. M., Melnyk, S., Pavliv, O., Hendrickson, H., Landes, R. D., Lumen, A., Tackett, A. J., Deutz, N. E. P., Hauer-Jensen, M., & Koturbash, I. (2017). Short-term dietary methionine supplementation affects one-carbon metabolism and DNA methylation in the mouse gut and leads to altered microbiome profiles, barrier function, gene expression and histomorphology. *Genes and Nutrition*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0576-0>

Neri, C., & Edlow, A. G. (2016). Effects of maternal obesity on fetal programming: Molecular approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026591>

- Norman, H. A., & Butrum, R. R. (2003). International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer: Introduction. *Journal of Nutrition*, 133(11 SUPPL. 1), 3740–3747.
- Orenbuch, A., Fortis, K., Taesuwan, S., Yaffe, R., Caudill, M. A., & Golan, H. M. (2019). Prenatal nutritional intervention reduces autistic-like behavior rates among mthfr-deficient mice. *Frontiers in Neuroscience*, 13(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00383>
- Prinz, P., & Stengel, A. (2017). Control of food intake by gastrointestinal peptides: Mechanisms of action and possible modulation in the treatment of obesity. In *Journal of Neurogastroenterology and Motility* (Vol. 23, Issue 2). <https://doi.org/10.5056/jnm16194>
- Ramamoorthy, T. G., Allen, T. J., Davies, A., Harno, E., Sefton, C., Murgatroyd, C., & White, A. (2018). Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats. *International Journal of Obesity*, 42(8), 1431–1444. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0094-1>
- Reynolds, R., & Stirrat, L. (2014). Effects of maternal obesity on early and long-term outcomes for offspring. *Research and Reports in Neonatology*. <https://doi.org/10.2147/rrn.s46783>
- Rivera, H. M., Christiansen, K. J., & Sullivan, E. L. (2015). The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 9(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00194>
- Rodriguez, A., Miettunen, J., Henriksen, T. B., Olsen, J., Obel, C., Taanila, A., Ebeling, H., Linnert, K. M., Moilanen, I., & Järvelin, M. R. (2008). Maternal adiposity prior to pregnancy is associated with ADHD symptoms in offspring: Evidence from three prospective pregnancy cohorts. *International Journal of Obesity*, 32(3). <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803741>
- Rush, E. C., Katre, P., & Yajnik, C. S. (2014). Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *European Journal of Clinical*

Nutrition, 68(1), 2–7. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.232>

Ryan, D. P., Henzel, K. S., Pearson, B. L., Siwek, M. E., Papazoglou, A., Guo, L., Paesler, K., Yu, M., Müller, R., Xie, K., Schröder, S., Becker, L., Garrett, L., Hölter, S. M., Neff, F., Rácz, I., Rathkolb, B., Rozman, J., Ehninger, G., ... Ehninger, D. (2018). A paternal methyl donor-rich diet altered cognitive and neural functions in offspring mice. *Molecular Psychiatry*, 23(5). <https://doi.org/10.1038/mp.2017.53>

Sailer, L., Duclot, F., Wang, Z., & Kabbaj, M. (2019). Consequences of prenatal exposure to valproic acid in the socially monogamous prairie voles. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39014-7>

Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6). <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>

Schaefer, C. A., Brown, A. S., Wyatt, R. J., Kline, J., Begg, M. D., Bresnahan, M. A., & Susser, E. S. (2000). Maternal prepregnant body mass and risk of schizophrenia in adult offspring. *Schizophrenia Bulletin*, 26(2). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033452>

Schmidt, R. J., Tancredi, D. J., Ozonoff, S., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L. C., Tassone, F., & Hertz-Picciotto, I. (2012). Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(1). <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004416>

Schwarting, R. K. W., & Wöhr, M. (2012). On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 45, Issue 4, pp. 337–348). <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500038>

- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 96. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Shorter, K. R., Felder, M. R., & Vrana, P. B. (2015). Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more always better? In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 118, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.03.007>
- Sie, K. K. Y., Li, J., Ly, A., Sohn, K. J., Croxford, R., & Kim, Y. I. (2013). Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on global and gene-specific DNA methylation in the liver of the rat offspring. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(4), 677–685. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200186>
- Speight, A., Davey, W. G., McKenna, E., & Voigt, J. P. W. (2017). Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 57, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.12.005>
- Stevens, A. J., Rucklidge, J. J., & Kennedy, M. A. (2017). Epigenetics, nutrition and mental health. Is there a relationship? *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1331524>
- Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Renzi, D., Calabrò, A., & De Filippo, C. (2017). New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>
- Sun, L., Ma, L., Ma, Y., Zhang, F., Zhao, C., & Nie, Y. (2018). Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. In *Protein and Cell* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0546-3>
- Tanda, R., Salsberry, P. J., Reagan, P. B., & Fang, M. Z. (2013). The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and Child Health Journal*, 17(2). <https://doi.org/10.1007/s10995-012-0964-4>

- Teixeira, A. E., Rocha-Gomes, A., Pereira dos Santos, T., Amaral, B. L. S., da Silva, A. A., Malagutti, A. R., Leite, F. R. F., Stuckert-Seixas, S. R., & Riul, T. R. (2020). Cafeteria diet administered from lactation to adulthood promotes a change in risperidone sensitivity on anxiety, locomotion, memory, and social interaction of Wistar rats. *Physiology and Behavior*, 220. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112874>
- The Jackson Laboratory. (2020). *BTBR T+ Itpr3tf/J*. <https://www.jax.org/strain/002282>
- Tremblay, M. W., & Jiang, Y. (2019). DNA Methylation and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. *Annual Review of Medicine*, 70(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-med-120417-091431>
- Tye, C., Runicles, A., Whitehouse, A. J. O., & Alvares, G. A. (2019). Corrigendum: Characterizing the Interplay Between Autism Spectrum Disorder and Comorbid Medical Conditions: An Integrative Review. *Frontiers in Psychiatry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00438>
- Van Lieshout, R. J., Robinson, M., & Boyle, M. H. (2013). Maternal pre-pregnancy body mass index and internalizing and externalizing problems in offspring. *Canadian Journal of Psychiatry*, 58(3). <https://doi.org/10.1177/070674371305800305>
- Veniaminova, E., Cespuglio, R., Cheung, C. W., Umriukhin, A., Markova, N., Shevtsova, E., Lesch, K. P., Anthony, D. C., & Strekalova, T. (2017). Autism-Like Behaviours and Memory Deficits Result from a Western Diet in Mice. *Neural Plasticity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9498247>
- Villamor, E., Rifas-Shiman, S. L., Gillman, M. W., & Oken, E. (2012). Maternal intake of methyl-donor nutrients and child cognition at 3 years of age. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 26(4), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2014.02.014>
- Vithayathil, M. A., Gugusheff, J. R., Ong, Z. Y., Langley-Evans, S. C., Gibson, R. A., & Muhlhausler, B. S. (2018). Exposure to maternal cafeteria diets during the

suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. *Nutrition and Metabolism*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0253-3>

Vonderwalde, I. (2019). DNA Methylation within the Amygdala Early in Life Increases Susceptibility for Depression and Anxiety Disorders. In *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* (Vol. 39, Issue 45). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0845-19.2019>

Warden, C. H., & Fisler, J. S. (2008). Comparisons of Diets Used in Animal Models of High-Fat Feeding. In *Cell Metabolism* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.014>

Waterland, R. A., Travisano, M., Tahiliani, K. G., Rached, M. T., & Mirza, S. (2008). Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *International Journal of Obesity*, 32(9), 1373–1379. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.100>

WHO. (2019). *Autism Spectrum Disorders*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>

WHO. (2020). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Wöhr, M., & Krach, S. (2017). Social Behavior from Rodents to Humans - Neural Foundations and Clinical Implications. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 30, Issue 30). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47429-8>

Wolff, G., Kodell, R., Moore, S., & Cooney, C. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in A/a mice. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12, 949–957. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.11.949>

Wolfrum, C., & Peleg-Raibstein, D. (2018). Maternal overnutrition leads to cognitive and neurochemical abnormalities in C57BL/6 mice. *Nutritional Neuroscience*,

0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1432096>

- Wright, T., Langley-Evans, S. C., & Voigt, J. P. (2011). The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiology and Behavior*, *103*(2), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.008>
- Yadon, N., Owen, A., Cakora, P., Bustamante, A., Hall-South, A., Smith, N., Felder, M. R., Vrana, P. B., & Shorter, K. R. (2019). A high methyl donor diet affects physiology and behavior in *Peromyscus polionotus*. *Physiology and Behavior*, *209*(June), 112615. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112615>
- Yochum, C. L., Bhattacharya, P., Patti, L., Mirochnitchenko, O., & Wagner, G. C. (2010). Animal model of autism using GSTM1 knockout mice and early post-natal sodium valproate treatment. *Behavioural Brain Research*, *210*(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.032>
- Yoo, H. (2015). Genetics of Autism Spectrum Disorder: Current Status and Possible Clinical Applications. *Experimental Neurobiology*, *24*(4). <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.257>
- Zeisel, S. H. (2009). Importance of methyl donors during reproduction 1-4. *American Journal of Clinical Nutrition*, *89*(2). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26811D>
- Zhang, Q., Wu, H., Zou, M., Li, L., Li, Q., Sun, C., Xia, W., Cao, Y., & Wu, L. (2019). Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *71*. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.002>