

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR



**EFFECTO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL POR DIETA HIPERCALÓRICA EN
EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN PERIFÉRICA Y CENTRAL, Y EN LA
CONDUCTA SIMILAR AL AUTISMO DE LA DESCENDENCIA DE RATONES**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORADO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA.**

PRESENTA

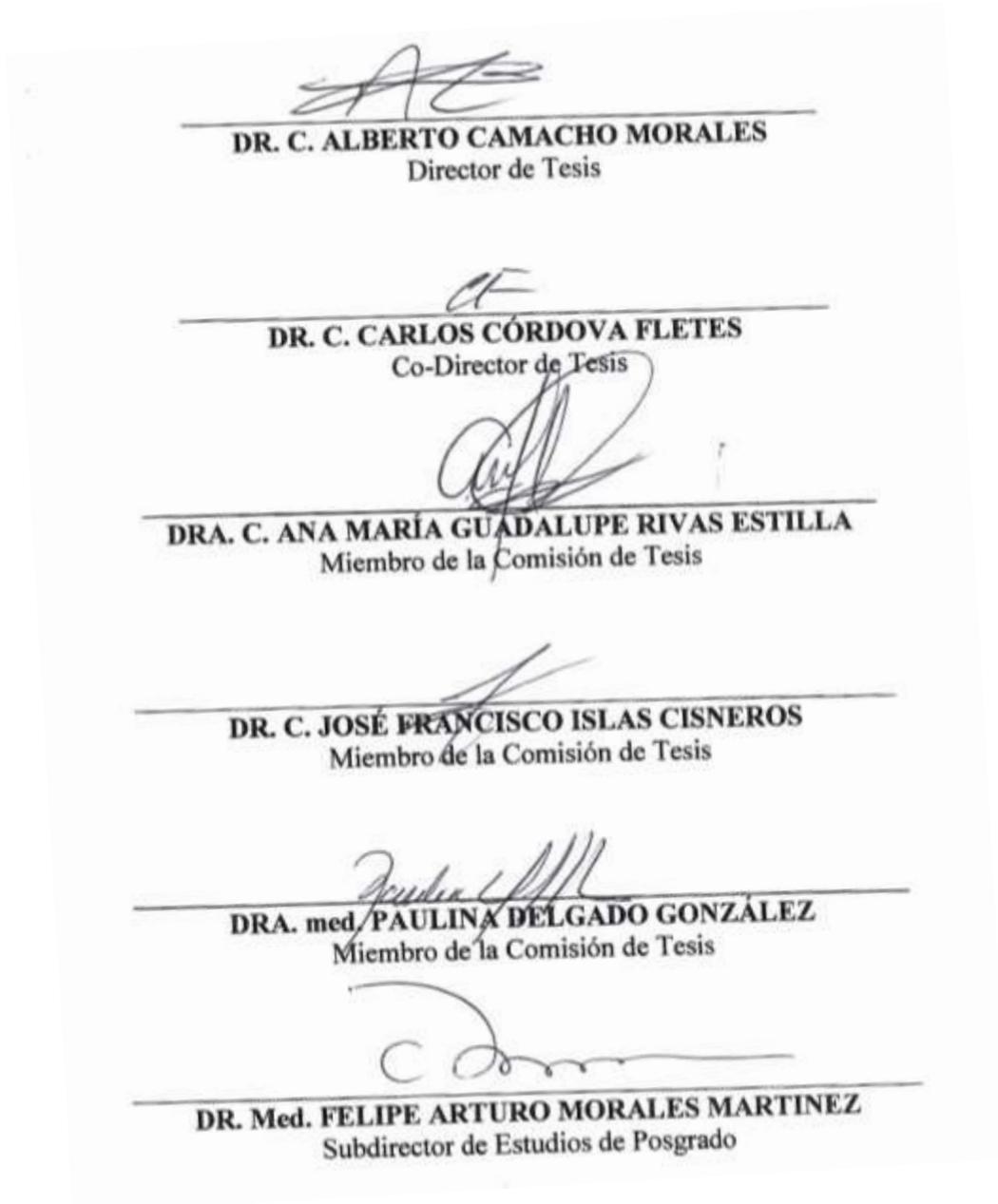
MC ROGER ALEXIS MALDONADO RUIZ

MONTERREY, NUEVO LEÓN

03 DE MARZO DE 2022

EFFECTO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL POR DIETA HIPERCALÓRICA EN EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN PERIFÉRICA Y CENTRAL, Y EN LA CONDUCTA SIMILAR AL AUTISMO DE LA DESCENDENCIA DE RATONES

Aprobación de Tesis



ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
FINANCIAMIENTO.....	vii
ÁREA DE TRABAJO.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
1 Trastorno del espectro autista (TEA).....	5
2 Alteraciones estructurales del cerebro en TEA.....	6
2.1 Corteza prefrontal	7
2.2 Amígdala	8
2.3 Cerebelo	11
2.4 Hipocampo	14
3. Etiología del autismo	15
3.1 Factores genéticos	16
3.2 Agentes químicos.....	18
3.3 Alteraciones inmunológicas.....	21
3.3.1 Inflamación perinatal como un factor de riesgo en el TEA.	23
3.3.1.1 Infección viral.....	23
3.3.1.2 Infección bacteriana.....	25
3.3.1.3 Inflamación metabólica.....	27
III.JUSTIFICACIÓN.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	32
1 Objetivo General.....	32
1.1 Objetivos específicos.....	32
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
i. Material biológico.....	33

ii. Materiales y reactivos.....	33
iii. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
1. Modelos de programación fetal.....	34
1.1. Programación con dieta control.....	34
1.2. Programación por activación inmune materna.....	35
1.3. Programación con dieta de cafetería.....	36
2. Ensayo de neutralización de MCP-1.....	37
3. Pruebas conductuales para evaluación de conducta parecida al autismo.....	40
3.1. Prueba de sociabilidad en 3 cámaras.....	40
3.2. Prueba de entierro de canicas.....	42
3.3. Prueba de entierro de campo abierto.....	42
4. Resonancia magnética nuclear basada en deformación (RMNM)...	43
4.1. Perfusión cardiaca.....	43
4.2. Obtención de imágenes de Resonancia Magnética Nuclear y su análisis por morfometría en base a deformación	44
4.3 Preprocesamiento ponderado en T1 y procesamiento de imágenes.....	45
5. Determinación del perfil de citocinas proinflamatorias.....	46
5.1. Colección de tejido fresco y análisis.....	46
5.2. Colección de plasma y análisis.....	46
6. Análisis histológico empleando inmunohistoquímica.....	47
7. Análisis estadístico.....	48
VII. RESULTADOS.....	49
VIII. DISCUSIÓN.....	76
IX. CONCLUSIONES.....	81
X. PERSPECTIVAS.....	82
XI. REFERENCIAS.....	83

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Dr. Alberto Camacho Morales por la confianza depositada en mí y por su constante apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Dra. Ana María Rivas Estilla por su compromiso e invaluable supervisión en el desarrollo de mi tesis.

Dr. José Francisco Islas Cisneros por sus valiosas observaciones y apoyo.

Dr. Carlos Córdova Fletes por sus asesorías y sugerencias

Dra. med. Paulina Delgado González por su asesoría y sugerencias

Al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina por brindarme las instalaciones necesarias para desarrollar este estudio

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización del proyecto de investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) por permitirme el uso de su equipo y facilitarme un área de trabajo para el desarrollo de este estudio

Al tecnológico de Monterrey por facilitarme el uso de sus equipos e instalaciones

A la Universidad de Monterrey por permitirme desarrollar parte de mi proyecto en sus instalaciones

DEDICATORIA

En todas las ocasiones que he escrito una tesis, he dejado este apartado para el final; nunca soy capaz de encontrar inspiración para llenar esta hoja y, aun así, no me gusta entregarla en blanco. Este trabajo es la culminación de los 9 años que pase en el laboratorio de Neurometabolismo. El psiquiatra Car Jung decía que en todos los seres humanos existen facetas de nuestra personalidad (“*sombras*”) que nos incomodan o atemorizan y nuestro objetivo no debe ser eliminarlas, sino, aceptarlas como parte de nosotros transformando estas “*sombras*” en “*mascaras*” o “*personas*” que nos permitan afrontar al mundo real. La reconciliación con nuestras “*sombras*” no se logra únicamente por medio de la introspección, por el contrario, es gracias a nuestros vínculos sociales que somos capaces de ver el mundo con otra perspectiva y de esta forma crear una “*persona*” capaz de atravesar todas las dificultades que se presenten en nuestra vida. Por esto, me parece imposible colocar un puñado de nombres y darles un agradecimiento frívolo. Muchas personas pasaron por mi vida en casi una década de formación científica, cada una de ellas me enseñó algo sobre ciencia, sobre mí, sobre la vida.

A esas personas, si algún día llegan a leer este manuscrito, sepan que los aprecio y agradezco todo lo que hicieron por mí... mis maestros, mis amigos del laboratorio, mis amigos de la vida, mis padres, mis hermanos y mi esposa Larisa, soy las persona que soy, gracias a ustedes y no me gustaría ser nadie más.

FINANCIAMIENTO

El financiamiento para desarrollar el presente trabajo se obtuvo del CONACYT, como parte de los proyectos Fondo Ciencia Básica 261420 y 255317 Además de la obtención de beca de doctorado del CONACYT para Roger Alexis Maldonado Ruiz No.573686.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL y el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL. Bajo la dirección del Dr. Alberto Camacho Morales. Para los análisis de resonancia magnética se emplearon las herramientas de análisis y procesamiento de imágenes del Laboratorio Nacional de Resonancia Magnética de la Universidad Nacional Autónoma de México dirigido por el Dr. Luis Concha Loyola.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Diagrama de las áreas de Brodmann en el cerebro humano...	8
2.	Conexiones aferentes y eferentes de la amígdala.....	9
3.	Circuitos neuronales del cerebelo.....	12
4.	Corte sagital del cerebelo de ratón.....	13
5.	Inervaciones sinápticas del hipocampo.....	14
6.	Asimilación de mercurio a partir de timerosal.....	20
7.	Convergencia de los mecanismos inflamatorios involucrados en autismo.....	29
8.	Modelos de programación fetal.....	36
9.	Ensayo de neutralización de MCP1 en los modelos de programación fetal.....	39
10.	Pruebas conductuales para la detección de una conducta similar al trastorno del espectro autista.....	41
11.	Resultados de la prueba de sociabilidad en machos.....	51
12.	Resultados de la prueba de sociabilidad en hembras.....	53
13.	Prueba de entierro de canicas.....	54
14.	Prueba de campo abierto.....	56
15.	Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en el plasma de los machos pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF.....	58
16.	Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en el plasma de las hembras pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF.....	59

17. Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en la corteza somatosensorial primaria (SSP) de los machos pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF.....	61
18. Resultados de la prueba de sociabilidad de los grupos administrados con solución salina o 1.6 µg de anticuerpo contra MCP-1 por 5 días.....	63
19. Prueba de entierro de canicas y campo abierto de los grupos administrados con solución salina o 1.6 µg de anticuerpo contra MCP-1 por 5 días.....	65
20. Resultados de la prueba de sociabilidad de los grupos administrados con anticuerpo isotipo IgG o 8 µg de anticuerpo contra MCP-1 por 3 días.....	67
21. Prueba de entierro de canicas y campo abierto de los grupos administrados con solución salina o 8 µg de anticuerpo contra MCP-1 por 3 días.....	69
22. Gráficos del Análisis por Resonancia Magnética Nuclear Morfométrica en base a deformación del grupo administrado con 1.6 µg de anticuerpo contra MCP-1 por 5 días.....	71
23. Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en el plasma de roedores administrados con 8µg/3 días de anticuerpo neutralizante y perfil de citocinas en CbX de los machos pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF.....	73
24. La inoculación sistémica de 8µg/3 días de anticuerpo neutralizante modifica la morfología de las células de la microglía en SSP.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Prevalencia del trastorno del espectro autista del 2000 al 2012 en Estados Unidos de América (CDC, 2017).....	6
2. Materiales y reactivos.....	33
3. Composición de la dieta de cafetería.....	37
4. Regiones que presentaron cambio de volumen en los grupos CON y CAF administrados con anticuerpo neutralizante de MCP-1 por 5 días.....	72

NOMENCLATURA

M	Molaridad
°C	Grados centígrados
g	Fuerza de gravedad
mL	Mililitros
μL	Microlitro
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
PBS	Solución buffer de fosfatos
IgG	Inmunoglobulina G
Ap	Anteroposterior
ML	Lateral
Dv	Dorsoventral
SSP	Corteza somatosensorial primaria
CbX	Lobulo 10 dle cerebelo
IL	Interleucina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
INF-γ	Interferon gamma
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF-β	Factor transformante beta
MCP-1	Proteina quimioatrayente de macrófagos
TEA	Trastorno del espectro autista
CAF	Dieta de cafeteria
Poly I:C	Ácido polinosinico-policitidilico
CNS	Sistema nervioso central
RMNM	Resonancia magnética nuclear basada en deformacion

RESUMEN

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

El trastorno del espectro autista (TEA) es una enfermedad caracterizada por reducción en la interacción social y comportamientos estereotipados relacionados a cambios volumétricos macroscópicos en el lóbulo X del cerebelo (CbX) y la corteza somatosensorial (SPP). Modelos epidemiológicos y preclínicos han confirmado que un perfil proinflamatorio durante el desarrollo fetal aumenta la susceptibilidad a TEA. En este estudio buscamos identificar el efecto de la gestacional a una dieta alta en grasa y azúcar (CAF) sobre el perfil proinflamatorio periférico y central, reactividad de la microglía y cambios volumétricos del cerebro relacionados con la baja sociabilidad en la descendencia de ratones. Encontramos un efecto sexo-dependiente de la exposición a dieta CAF o Poli (I: C) en el perfil proinflamatorio periférico y sociabilidad en la descendencia, lo que se traduce en una reducción de la interacción social y aumentando la ansiedad en machos, pero no en hembras. Además, la exposición a dieta CAF o Poli (I: C) promueve un estado proinflamatorio en la periferia en machos diagnosticados con TEA, pero no en hembras. A demás, identificamos una acumulación robusta de la proteína quimio atrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en el plasma de machos con diagnóstico de TEA expuestos a CAF durante el desarrollo. A demás, la inyección sistémica de anticuerpo neutralizante de MCP-1 restableció la interacción social y ansiedad, acompañada de una reducción en el volumen del lóbulo CbX y un aumento del volumen de SSP en la descendencia masculina. Estos datos demuestran la importancia de la activación de la vía de MCP-1 por dieta sobre cambios volumétricos del cerebro y morfología de la microglía que promueven un comportamiento similar al TEA en ratones machos.



Dr. Alberto Camacho Morales
(Director de Tesis)



MC Roger Alexis Maldonado Ruiz
(Estudiante)

ABSTRACT

1
2 Autism spectrum disorder (ASD) is a disease characterized by reduced social
3 interaction and stereotypic behaviors and related to macroscopic volumetric changes in
4 cerebellar and somatosensory cortices (SPP). Epidemiological and preclinical models have
5 confirmed that a proinflammatory profile during fetal development increases ASD
6 susceptibility after birth. Here, we aimed to globally identify the effect of maternal exposure
7 to high-energy dense diets, which we refer to as cafeteria diet (CAF) on peripheral and central
8 proinflammatory profiles, microglia reactivity, and volumetric brain changes related to
9 assisting defective social interaction in the mice offspring. We found a sex-dependent effect
10 of maternal exposure to CAF diet or inoculation of the dsARN mimetic Poly (I:C) on
11 peripheral proinflammatory and social interaction in the offspring. Notably, maternal
12 exposure to CAF diet impairs impaired social interaction and favors favored an increase in
13 anxiety in male but not female offspring. Also, CAF diet exposure or Poly (I:C) inoculation
14 during fetal programming promote peripheral proinflammatory profile in the ASD-diagnosed
15 male but not in females. Selectively, we found a robust accumulation of the monocyte
16 chemoattractant protein-1 (MCP-1) in plasma of ASD-diagnosed males exposed to CAF
17 during fetal development. Biological assessment of MCP-1 signaling in brain confirms
18 confirmed that systemic injection of MCP-1-neutralizing antibody reestablished social
19 interaction and blocked anxiety, accompanied by a reduction in cerebellar lobule X (CbX)
20 volume and an increase volume of the primary somatosensory (SSP) cortex in male offspring.
21 These data highlight the contribution of diet-dependent MCP-1 signaling on volumetric brain
22 changes and microglia morphology promoting ASD-like behavior in male mice
23

I. INTRODUCCIÓN

El trastorno del espectro autista (TEA) engloba un grupo de discapacidades del desarrollo que pueden provocar problemas sociales, comunicacionales y conductuales (CDC 2017). Se estima que el TEA tiene una prevalencia de 1 por cada 44 niños estadounidenses [1], mientras que en México se propone existen 12 por cada 115 individuos [2]. A nivel cerebral, los niños con este padecimiento exhiben cambios de volumen selectivos de cada región cerebral. Por ejemplo, pacientes con TEA presentan mayor número de neuronas (67%) en la corteza prefrontal (CPF) [3], mientras que en la corteza somatosensorial hay reducción en el número de neuronas maduras [4]. El cerebelo, por su parte, presenta disminución del número (25%) y densidad total de células de Purkinje (24%) [5–7], mientras que en otros estudios se ha visto incremento de volumen total del cerebelo [8].

Sujetos con TEA también presentan altas concentraciones de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), interferón (INF- γ) y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en el cerebro y suero [9, 10]. En los últimos años, los investigadores han tratado de determinar las posibles causas que promueven la acumulación de citocinas inflamatorias en los sujetos con TEA. Una de las propuestas explica que infecciones intrauterinas durante el embarazo incrementan la concentración de citocinas proinflamatorias en el cerebro de la madre y el feto, y disminuyen las citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β) en el líquido amniótico de sujetos que manifiestan el desarrollo del TEA [11]. Estos datos se corroboran con estudios epidemiológicos que confirman que las infecciones virales como el herpes simple tipo 2 (VHS-2) incrementa en un 2.07% el riesgo de TEA [12]. Adicionalmente, estudios preclínicos demuestran que la activación sintética de la respuesta inmune por la administraron análogos de RNA viral (Poly I:C) a modelos murinos de ratas embarazadas, incrementó la producción de citocinas

1 proinflamatorias en suero y cerebro, y además favoreció el comportamiento parecido al
2 autismo en su descendencia [4, 13–15]. Notablemente y de interés para el presente proyecto,
3 un índice de masa corporal (IMC) mayor a 25, en mujeres embarazadas, se ha identificado
4 incrementa en un 1.3% el riesgo de TEA [16, 17] En este contexto, estudios preclínicos de
5 nuestro grupo de investigación aún no publicados confirman que la exposición a una dieta
6 hipercalórica a ratas durante el embarazo y la lactancia, induce incremento de citosinas
7 proinflamatorias en plasma en la descendencia. Además, recientemente reportamos que la
8 descendencia de madres expuestas a dieta hipercalórica presentan activación de la microglía
9 en el hipocampo, un clásico marcador de inflamación cerebral [18].

10 En su conjunto, las infecciones virales, la inflamación sistémica y central inducida
11 por la exposición a dieta con alto contenido energético, comparten la activación de los
12 receptores (TLR4) y de sus proteínas efectoras (TBK1, IFIT1) [19]. Por esta razón,
13 proponemos que los estímulos inflamatorios durante el embarazo son capaces de inducir
14 cambios negativos en el volumen de estructuras cerebrales implicadas en la conducta
15 parecida al autismo en la descendencia y favorecer la predisposición a presentarla en etapas
16 tempranas de la vida postnatal.

17

18

19

20

21

22

23

II. ANTECEDENTES

1. Trastorno del espectro autista (TEA)

El trastorno del espectro autista (TEA) es un padecimiento incurable que altera el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en el que se ve afectada la capacidad del individuo de procesar estímulos externos que conllevan a una deficiente respuesta a su entorno. Esto se ve reflejado en una pobre capacidad para socializar, presentar déficit en comunicación verbal y no verbal, así como patrones de comportamiento repetitivos [20]. Las regiones del cerebro involucradas en este trastorno abarcan a la corteza prefrontal, amígdala, hipocampo y cerebelo [21–23].

De acuerdo con un estudio realizado por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), entre el año 2000-2012, se reportó un incremento en la prevalencia de TEA de casi el 50%, con reportes de 1 en 150 casos en el año 2000, hasta la alarmante cifra de 1 en 68 casos para el 2012 en Estados Unidos de América; siendo los varones la población más vulnerable con una prevalencia del 2.36% , mientras que la susceptibilidad del grupo femenino es casi 4 veces menor, con una prevalencia de 0.53% [24] (Tabla 1). En México, no se conocen con precisión los porcentajes actuales y sólo se cuenta documentada en una investigación publicada en año 2016 mencionando que la prevalencia asciende a 12 casos por cada 115 nacimientos, es decir, 400,000 niños mexicanos entre 0 y 8 años presentan este padecimiento [2]. De acuerdo con esta estadística, la incidencia de TEA en México es 10 veces mayor que en los reportes de los Estados Unidos de América.

2. Alteraciones estructurales del cerebro en TEA

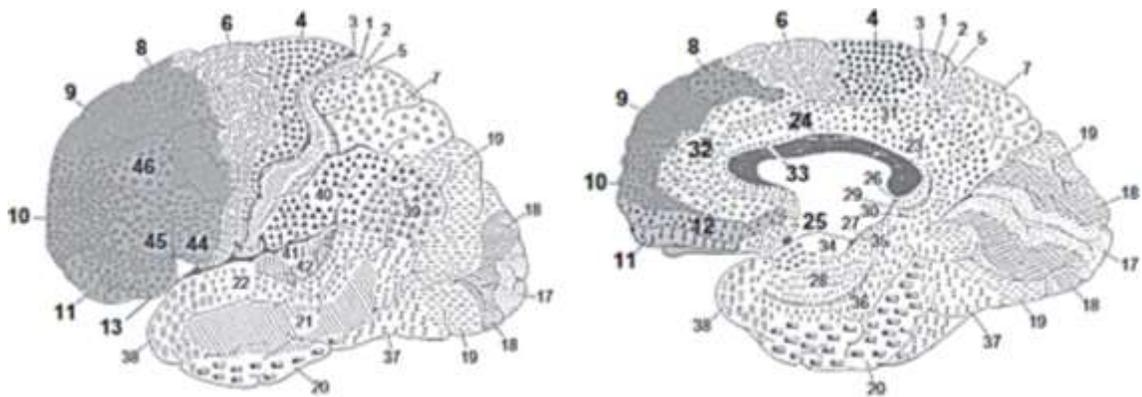
A diferencia de lo que sucede en otras afecciones de naturaleza neurodegenerativa del SNC, como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson, etc., el TEA no posee una neuropatología característica que pueda emplearse como diagnóstico preciso de la enfermedad, es decir, su diagnóstico se basa exclusivamente en el comportamiento de los individuos y en los síntomas neurológicos [25]. Sin embargo, estudios adicionales han enriquecido las estrategias de diagnóstico incluyendo marcadores fisiológicos de alteraciones estructurales y bioquímicas presentes en diversas regiones cerebrales[26], las cuales serán revisadas a continuación.

Año de registro	Año de nacimiento	Prevalencia por cada 1,000 niños	1 en X niños
2000	1992	6.7 (4.6-9.9)	1 en 150
2002	1994	6.6 (3.3.-10.6)	1 en 150
2004	1996	8 (4.6-9.8)	1 en 125
2006	1998	9 (4.2-12.2)	1 en 110
2008	2000	11.3 (4.8-21.2)	1 en 88
2010	2002	14.7 (5.7-21.9)	1 en 68
2012	2004	14.6 (8.2-24.6)	1 en 68

Tabla 1. Prevalencia del trastorno del espectro autista del 2000 al 2012 en Estados Unidos de América (CDC, 2017).

2.1 Corteza prefrontal

1
2 La corteza prefrontal (CPF), comprende diversas áreas de Brodmann, anterior a la
3 corteza motora primaria y a la corteza premotora (Figura 1). La CPF está involucrada en el
4 lenguaje, procesamiento emocional y socialización; así como en procesos cognitivos de alto
5 nivel, agrupados bajo el termino de “funciones ejecutivas”. Las funciones ejecutivas incluyen
6 el monitoreo de la memoria de trabajo, mantenimiento de la atención y la coordinación de
7 conductas dirigidas hacia un objetivo [27]. La CPF se ve afectada en varias patologías
8 relacionadas al SNC, como la esquizofrenia y el autismo. Una de las características más
9 destacables en un cerebro con TEA es el tamaño; por ejemplo, niños con este padecimiento
10 exhiben cerebros con tamaños superiores a la media, dado por un crecimiento anormal de la
11 materia blanca y gris [28, 29]. La CPF se ve afectada de manera similar, en infantes con TEA
12 de una edad entre los 2 y 9 años se observa un incremento en el volumen de la CPF
13 dorsolateral que llega a ser del 10%, mientras que los controles sanos presentan un
14 crecimiento del 38% [30]. Por su parte, la materia blanca ubicada en los tractos de la CPF,
15 presenta incremento de volumen del 38% en niños autistas con edades entre los 5 y 11 años
16 en comparación a sus pares sanos [31]. El incremento en el volumen observado puede deberse
17 a que los pacientes con TEA presenta un número mayor de neuronas en la CPF que los grupos
18 sanos, por ejemplo, niños con TEA presentan incremento del 67% de neuronas en esta región
19 del cerebro y el 79% más de neuronas en la CPF dorsolateral [3].



1

Figura 1. Diagrama de las áreas de Brodmann en el cerebro humano. En este diagrama se puede observar la corteza prefrontal, la “región frontal” abarca las áreas de Brodmann 8, 9, 10, 11, 13, 44, 45 y 46, el área 47 es referida como “subfrontal”; mientras que las áreas 4 y 6 forman la región “precentral”, finalmente la región cingulada comprende las áreas 24, 25, 32 y 33. *Modificada de Teffer y Semendeferi, 2012.*

2

3 Adicionalmente, estudios preclínicos empleando modelos murinos de TEA por
 4 exposición perinatal a ácido valproico (AV), compuesto que inhibe a las desacetilasas, ha
 5 demostrado la disminución del grosor de la región Cg1 de la CPF, mientras que la región
 6 prelímbica Cg3 muestra incremento en su grosor [32]. Por su parte, en la corteza prefrontal
 7 media (mPFC) se observó un espacio interneuronal más amplio que el de los controles, junto
 8 con un incremento de la proteína ácida fibrilar glial (PAFG) y sinaptofisina (SYN) [33].

9

10

2.2 Amígdala

11

12

13

14

15

16

17

El término “amígdala” fue utilizado para referirse a un grupo de núcleos situados en el lóbulo temporal anterior del ser humano, cuya forma asemeja a una almendra. Actualmente, se sabe que la amígdala comprende cerca de 13 núcleos con citoarquitectura, histoquímica y patrones de conectividad específicos [34]. Cada núcleo se divide en 3 grupos: **1) Grupo basolateral**, incluye los núcleos, lateral (L), basal (B) y accesorio basal (AB); **2) Grupo cortical**, comprende al núcleo lateral del tracto olfatorio (NLOT), núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio (BAOT), núcleo cortical anterior y posterior (CoA y CoP) y

1 corteza preamigdalóide (PAC) y **3) Grupo centro-medial**, está formado por el núcleo medio
2 (M) y central (CeA), núcleo del lecho de la estría terminal (BNST).

3 Cada uno de los núcleos de la amígdala recibe señales aferentes específicas de
4 distintas regiones del cerebro, que incluyen a las señales sensoriales del núcleo talámico y la
5 corteza, así como hipocampo, corteza prefrontal, estructuras parahipocámpales e hipotálamo.
6 En la Figura 2 se pueden apreciar de forma simplificada las distintas conexiones aferentes y
7 eferentes de la amígdala que se integran con otras regiones del cerebro [35].

8

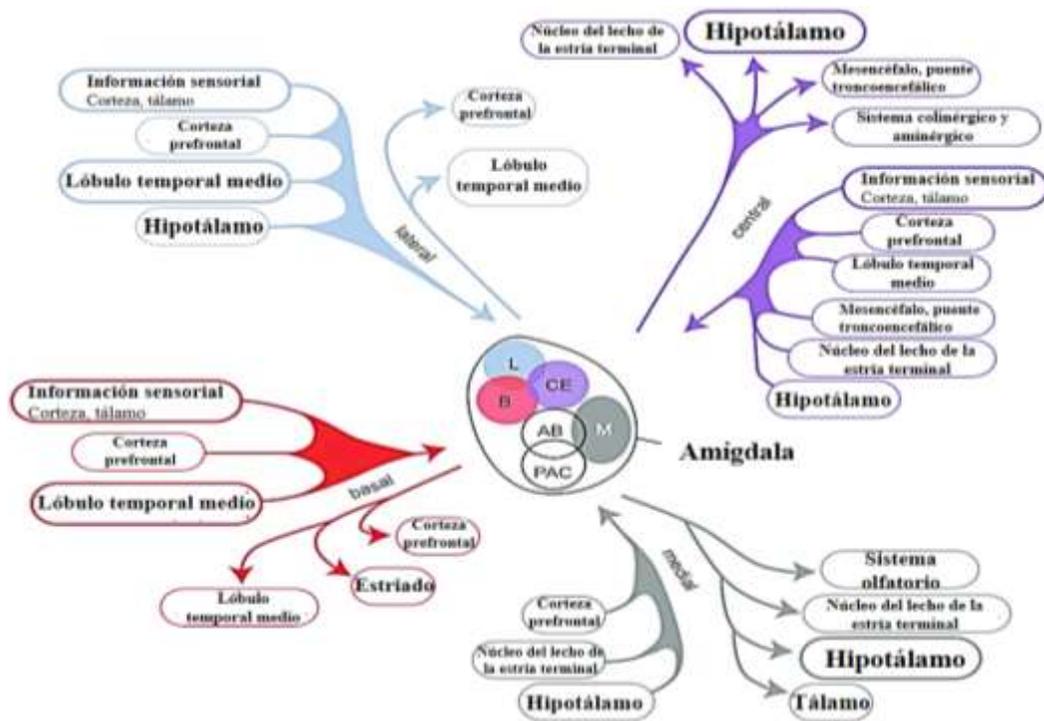


Figura 2. Conexiones aferentes y eferentes de la amígdala. La amígdala es inervada en su núcleo basal (B) por la corteza cerebral, estriado, corteza prefrontal y lóbulo temporal. El lateral (L) interactúa con la corteza prefrontal, hipotálamo, tálamo y lóbulo medio temporal. Por su parte, el núcleo medio recibe señales de la corteza prefrontal, hipotálamo, sistema olfatorio y el lecho del núcleo del estriado terminal. Finalmente, el núcleo central (CN) es inervado por el tálamo, corteza prefrontal, hipotálamo y la corteza.

9 La amígdala está implicada en la toma de decisiones y la percepción social, expresión
10 emocional y miedo [36, 37]. Debido al papel de la amígdala en la percepción, codificación y
11 recuperación de información emocional se le ha implicado en el TEA [38]. Las alteraciones

1 relacionadas a la amígdala en pacientes que sufren de TEA son, empaquetamiento celular en
2 los núcleos central, medio y cortical de un 40%, 28% y 35%, respectivamente, además de un
3 tamaño celular disminuido [39]. En años recientes, se ha identificado una disminución en el
4 volumen de la amígdala derecha, acompañado de ansiedad [40], debido a una disminución
5 en el número de neuronas en núcleos como el L [5]. Similarmente, se ha reportado que existe
6 una correlación positiva entre el incremento del volumen de la amígdala con un mejor
7 desempeño conductual en ensayos de contacto visual [41]. Estudios preclínicos empleando
8 exposición perinatal a AV se ha observado una disminución en el volumen del núcleo
9 basolateral a los 35 y 70 días posnatales [32]. Además, el AV disminuye el volumen total de
10 los núcleos central, medio y cortical, a la par que reduce la interacción social y genera
11 ansiedad en la edad adulta, fenómenos que correlacionan con una alta producción de los
12 micro ARN mir-181c y mir-30d [42]. Estos eventos moleculares se correlacionan con el
13 efecto del AV en la inhibición de las histonas deacetilasa favoreciendo alteraciones
14 epigenéticas en el cerebro durante el desarrollo [43]. Este hallazgo fortalece la idea de que al
15 menos algunos cambios observados en el SNC de sujetos con TEA, pudieran bien ser
16 asociados a alteraciones en mecanismos que regulan la transcripción de genes [44, 45]. Por
17 otro lado, se ha determinado en modelos genéticos de TEA la acumulación de células de la
18 microglía en el núcleo basolateral de la amígdala [46]. De interés, se ha reportado la
19 correlación positiva entre el incremento de células dendríticas en sangre con el crecimiento
20 anormal de la amígdala izquierda y derecha en niños de 2 a 4 años [47]. Estos datos sugieren
21 que mecanismos inflamatorios y estímulos perinatales pueden modular el desarrollo
22 volumétrico y estructural de la amígdala e incrementar la susceptibilidad al desarrollo de
23 TEA. La relación entre inflamación cerebral y el desarrollo de conductas aberrantes
24 semejantes a las del TEA se abordará más adelante.

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

2.3 Cerebelo

El cerebelo está compuesto por una gran variedad de poblaciones neuronales que integra acciones de inhibición y activación sináptica [48, 49]. Las neuronas excitatorias utilizan glutamato e incluyen a las células granulosas, neuronas unipolares y células eurodendroides. Las neuronas inhibitoras utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) y/o glicina y agrupan a las células de Purkinje y las interneuronas, que comprenden a las células estrelladas, células en canasta, células de Golgi; estas últimas inervan a las células de Purkinje [48, 50]. Las neuronas cerebelares reciben señales excitatorias de núcleos precerebelares a través de dos fibras principales, la fibra trepadora y la fibra musgosa [51]. La red neuronal que existe entre las subpoblaciones celulares del cerebelo se esquematiza en la Figura 3.

Las neuronas y las fibras neuronales del cerebelo se organizan en una estructura de tres capas, la parte más superficial de la estructura es la capa molecular (ML), seguida por la capa Purkinje o capa ganglionar (PCL), finalmente a la capa más profunda se le llama capa granular (GCL) (Figura 4).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

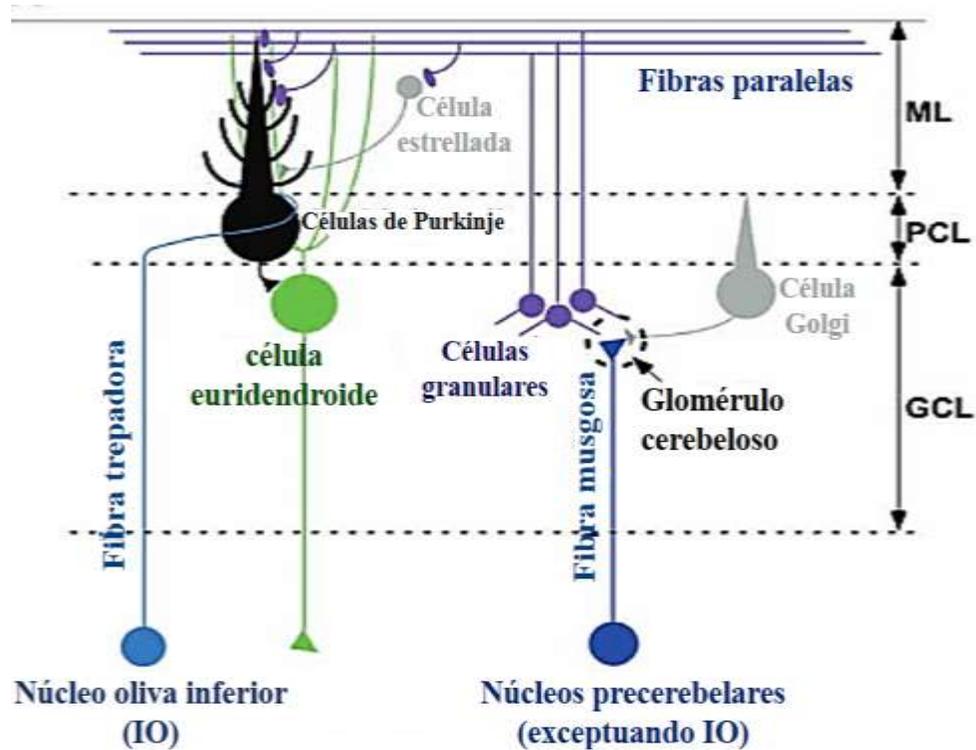


Figura 3. Circuitos neuronales del cerebelo. 1) Fibra trepadora, sus neuronas se originan del núcleo oliva inferior (IO) e inervan a las dendritas de las células de Purkinje. 2) Fibra musgosa, sus neuronas se originan de los núcleos precerebelares (excepto el IO) como el núcleo vestibular, cuyas células granulares inervan los axones de las células de Golgi para formar el glomérulo cerebelar. La información recibida por la fibra musgosa viaja por los axones (fibras paralelas) de las células granulares hasta las dendritas de las células de Purkinje. La actividad neural de la fibra trepadora inhibe la transmisión sináptica de las fibras paralelas cuando las células de Purkinje reciben estímulo simultáneos, por un mecanismo llamado depresión a largo plazo (LTD). *Modificado de Hibi y Shimizu, 2011.*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

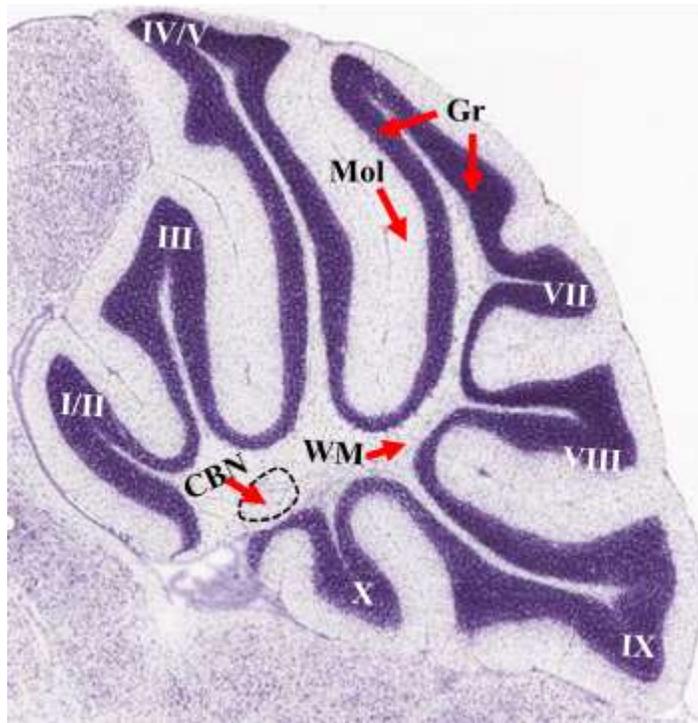


Figura 4. Corte sagital del cerebelo de ratón. En el corte se aprecian las capas que conforman al cerebelo, capa molecular (Mol), capa granular (Gr) y materia blanca (WM), núcleo cerebelar (CBN). Lóbulos cerebelares I, II, III, IV, V, VI, VII, VII, IX & X.

El cerebelo regula las funciones motoras que implican un movimiento delicado y preciso, y está involucrado en funciones cognitivas elevadas, así como en funciones emocionales [52, 53]. Al igual que con otras regiones del SNC, alteraciones en el cerebelo han sido implicadas en autismo, mostrando alteraciones en el volumen de las estructuras [7]. Sin embargo, los resultados obtenidos son variables, en donde en algunos estudios se ha documentado reducción en lóbulos del cerebelo [54], mientras que en otros se observa un incremento en el volumen total del cerebelo en pacientes con TEA [55], o incluso, algunos otros reportes no identifican alteraciones en el volumen [6, 56, 57]. De interés, lo que sí es persistente es la disminución del número y densidad total de células de Purkinje en el cerebelo de un 25% y 24%, respectivamente, en los sujetos con TEA [5–7].

1
2
3
4
5
6
7

2.4 Hipocampo

En humanos, el hipocampo es una estructura elongada localizada dentro del lóbulo temporal medio. En roedores, es una estructura grande en forma de nuez, ubicada bajo el neocórtex. Una de las características más destacables del hipocampo es su conectividad anatómica, llamada circuito trisináptico (Figura 5) [58].

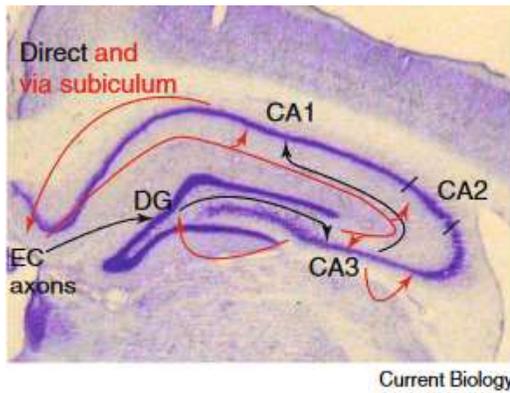


Figura 5. Inervaciones sinápticas del hipocampo. Las líneas negras describen el circuito, mientras que las líneas rojas esquematizan las conexiones del hipocampo, incluyendo inervaciones directas de la corteza entorrinal (EC) con las tres regiones CA, la vía de retroalimentación que va del EC hacia el subículo; así como el circuito de retroalimentación entre CA3 y el giro dentado (DG). Tomado de *Knierim, 2015*.

8

9 El hipocampo es el centro anatómico encargado de la memoria declarativa (explícita),
10 que involucra eventos y hechos, para lugares, personas y objetos [59]. La memoria
11 declarativa se puede subdividir en 2 categorías: 1) Memoria episódica, que se refiere a la
12 recolección de información de un evento específico en el pasado del individuo, relacionado
13 a un tiempo y lugar específico; y 2) Memoria semántica, involucra al conocimiento general
14 acerca del mundo que rodea al sujeto [58, 59].

15 Defectos en la función del hipocampo se han relacionado con enfermedades
16 neurodegenerativas que incluyen a la enfermedad de Alzheimer y TEA [58, 60]. Las
17 alteraciones estructurales observadas en el hipocampo de pacientes con TEA incluyen el
18 incremento en el empaquetamiento de la densidad celular [39]. Además, se presenta un
19 cuerpo celular pequeño en las neuronas de la región CA4, y número reducido de dendritas en
20 las neuronas piramidales de las regiones CA1 a la CA4 [61]. En años más recientes se ha

1 encontrado que pacientes con autismo presentan una reducción en la masa del lóbulo derecho
2 del hipocampo [41]. Además, estudios preclínicos empleando un modelo murino de TEA
3 inducido por exposición perinatal a AV se observó incremento del empaquetamiento de la
4 densidad celular en las regiones CA1, CA2, CA3, el giro dentado y el subículo en el
5 hipocampo en ratones con conducta semejante al autismo [62]. Empleando el mismo modelo
6 se observó que animales tratados con AV, presentaban un peso menor a los 14 y 23 días
7 posnatales, así como un retraso en la apertura de los ojos, observado el día posnatal 16,
8 comparado con el posnatal 14 identificado en el grupo. Los sujetos también mostraron
9 deficiencias en pruebas de nado y de geotaxia, comportamiento de exploración disminuido y
10 carencia en socializar. Además, se observó arreglo espacial desorganizado de las regiones
11 hipocampales CA3, la capa piramidal y granular del giro dentado e incremento de la proteína
12 ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de astrocitos, en CA3 y de la proteína de adhesión
13 de células neuronales (NCAM), proteína encargada de las uniones neurona-neurona, y un
14 déficit de sinaptofisina (SYN), proteína encargada del transporte de vesículas hacia la
15 membrana plasmática [33]. El déficit de SYN podría indicar un fallo sináptico en las células
16 del hipocampo, debido a que esta proteína es importante en la secreción de vesículas [63].

17

18 **3. Etiología del autismo**

19 Adicional a los cambios estructurales en el cerebro de los sujetos con autismo, no se
20 conoce con precisión las principales causas que promueven su desarrollo. Se han propuesto
21 numerosos candidatos que pudieran explicar dichas alteraciones, entre los que se incluyen
22 aspectos genéticos, ambientales e inmunológicos. Selectivamente se han documentado
23 inserciones y duplicaciones en el genoma, exposición a agentes tóxicos (timerosal y
24 talidomida), xenobióticos, alteración en neurotransmisores, enfermedades autoinmunes,

1 infecciones bacterianas en estadios tempranos de gestación, así como estados
2 proinflamatorios [10]. A continuación, se describirá la contribución de estos factores en el
3 desarrollo del TEA.

4

5 ***3.1 Factores genéticos***

6 Evidencia epidemiológica demuestra que un gran porcentaje de sujetos con TEA
7 puede estar relacionado con alteraciones de la expresión génica de genes selectivos
8 implicados en la función cerebral. Estudios empleando gemelos monocigóticos (MZ o
9 gemelos idénticos) así como dicigóticos (DZ o gemelos no idénticos), identificaron una
10 concordancia del 60% en MZ, mientras que en los grupos DZ solo se observó el 5%,
11 porcentaje similar al observado entre hermanos consanguíneos [64]. La evidencia científica
12 sugiere que las alteraciones genéticas responsables del autismo son mutaciones *de novo*, las
13 cuales pueden heredarse en un porcentaje cercano al 54% [65, 66], y que comúnmente son
14 duplicaciones en el loci 7q11.23, también se ha encontrado deleciones y duplicaciones en
15 16p11.2, 16p13.2 y 13.33. De interés, estos loci incluyen genes que se han reportado
16 incrementan el riesgo de la enfermedad tales como la NRXN1, SHANK3, Neurexina 1,
17 FLJ16237, A2BP1/FOX-1 y FHIT [44, 67, 68]. Si bien, existe la caracterización de un gran
18 número de mutaciones en el TEA, a la fecha se conocen cerca de 800 genes alterados, sin
19 embargo, no todos los individuos muestran el fenotipo característico de la patología, por lo
20 que a pesar de la caracterización genómica es difícil identificar firmas genéticas comunes a
21 la enfermedad [69]. Ante esta limitante, buscar convergencias entre los genes de riesgo
22 parece mostrar un mejor diseño con propósitos de diagnóstico. Partiendo de esta premisa, se
23 ha encontrado que la mayoría de los genes de riesgo de TEA están involucrados en la
24 regulación de la cromatina y el proceso de transcripción como ejemplo se han documentado,

1 alteraciones en la helicasa con cromodominio de unión a ADN 8 CHD8) y la proteína de
2 retraso mental del cromosoma X frágil (FMRP) [45, 69].

3 Si bien las características fenotípicas de un individuo se heredan por la transferencia
4 de modificaciones en la secuencia del ADN a través de la línea germinal, estudios recientes
5 han demostrado que dichos rasgos pueden ser transmitidos a través de mecanismos
6 epigenéticos o impronta génica [70–72]. En este concepto, perturbaciones ambientales en la
7 homeostasis de un individuo, incluyendo la exposición a estrés, retos nutricionales,
8 infecciones, etc. favorecen la presencia de efectos epigenéticos sobre el ADN del sujeto y
9 modulan la expresión selectiva de genes que coordinan sus funciones fisiológicas, un
10 fenómeno fisiológico conocido como programación fetal de la descendencia. Esto puede
11 tener consecuencias funcionales en la descendencia durante el desarrollo y/o en la edad
12 adulta, y provocar manifestaciones conductuales específicas que pudieran transmitirse
13 inclusive a generaciones posteriores sin el desencadenante inicial [71, 73]. Distintos estudios
14 han demostrado que el cerebro es el órgano con el mayor número de genes improntados y
15 por esta razón, es el órgano que pudiera presentar mayor vulnerabilidad a las alteraciones
16 ambientales [74, 75]. En este contexto, diversos desórdenes neuronales se han relacionado
17 con modificaciones en la impronta cerebral, como el síndrome Beckwith-Wiedemann,
18 síndrome de Rett, síndrome del cromosoma X frágil y síndrome de Angelman [76–78].
19 Estudios clínicos y preclínicos han documentado que la exposición a estímulos estresantes
20 durante la gestación que incluye el consumo crónico de alcohol, promueve la alteración del
21 desarrollo, función y comportamiento de la descendencia [79], y algunos otros estudios han
22 documentado la generación de inmunodeficiencias en la descendencia [80, 81]. Hablando
23 específicamente del TEA, se conoce que alteraciones ambientales durante el embarazo
24 favorecen el desarrollo del Síndrome de Rett, el tipo de autismo más común en mujeres [82].
25 Además, otros estímulos como infecciones virales han demostrado inducir conducta similar

1 al autismo en ratas [4, 13], asociado con la activación aberrante de la respuesta inflamatoria
2 en el cerebro [13–15].

3 Conociendo que fenómenos de programación fetal se han relacionado con el
4 desarrollo del TEA en la descendencia y que una gran mayoría de las mutaciones
5 involucradas con este padecimiento afectan genes de regulación transcripcional, se propone
6 que la exposición a agentes estresantes durante el embarazo podría representar uno de los
7 factores determinantes para el desarrollo del TEA en los descendientes (ver sección 3.3.1).

8

9

10

3.2 Agentes químicos

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

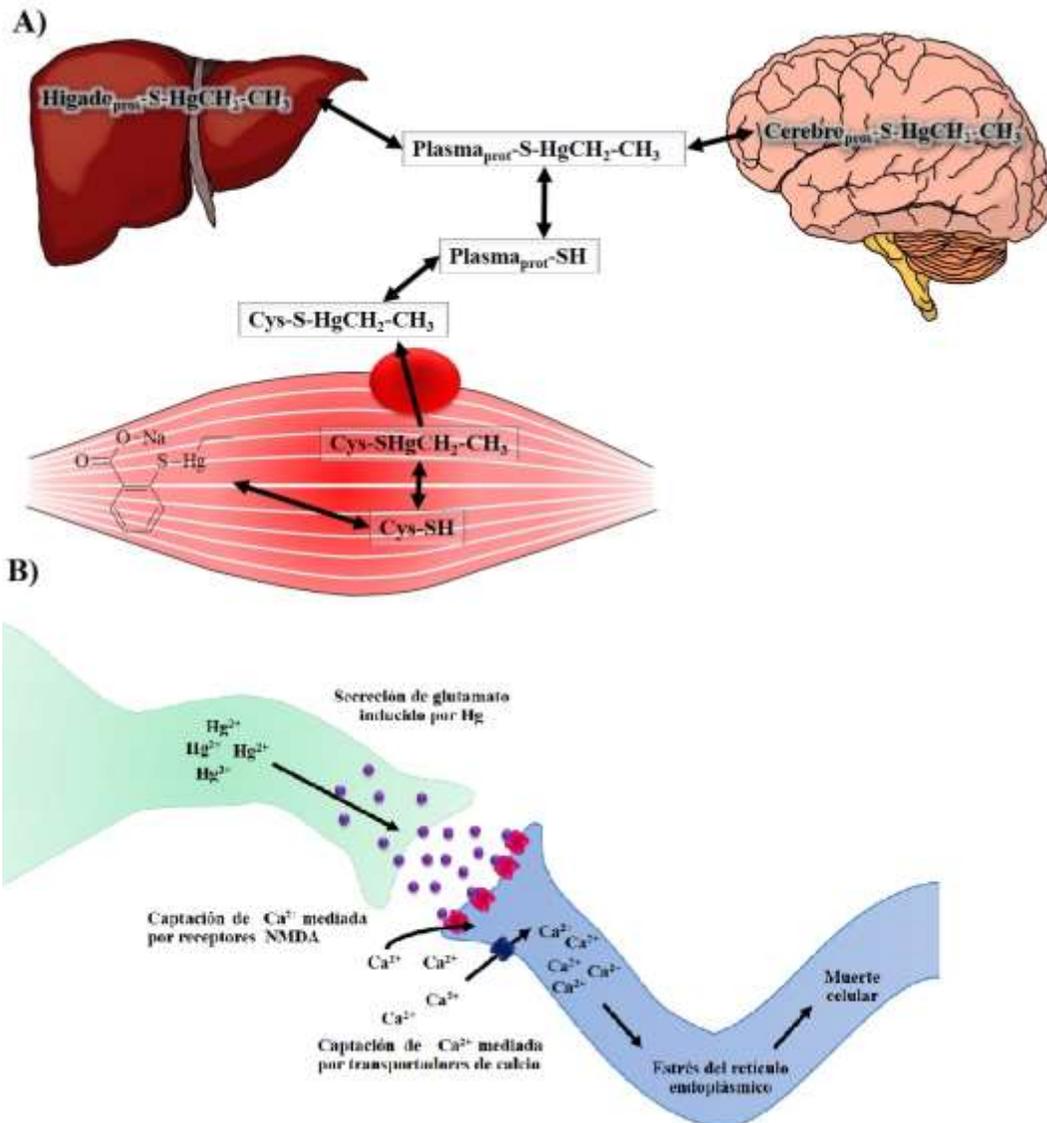
23

24

25

A pesar de ser un tema controversial [83, 84], a lo largo de los años, la evidencia científica ha sugerido que el timerosal es un agente de riesgo para el desarrollo de autismo [84–86]. El timerosal es un compuesto orgánico a base de mercurio formado por salicilato de sodio unido a una molécula de etilmercurio (etHg), el cual es empleado como un agente conservante en vacunas [87]. El metabolismo de etHg inicia cuando la molécula ingresa al músculo, donde forma enlaces tioester con proteínas y/o péptidos ricos en cisteína, creando el complejo etHgS-Cys, el cual es transportado hacia el exterior de la célula por una proteína involucrada en el transporte de metionina [88–91]. Una vez fuera de la célula, el grupo etHg se transfiere a proteínas del plasma ricas en enlaces tioester mediante una reacción de sustitución, en este punto es transportado hacia órganos como hígado, páncreas y el SNC, donde ejerce sus efectos tóxicos [91]. De hecho, el SNC representa el principal blanco de la mayoría de los compuestos orgánicos a base de mercurio [92, 93]. Molecularmente se conoce que el etHg impide el flujo de calcio (Ca^{2+}) hacia los sinaptosomas del cerebro [94], contrariamente, el bloqueo del etHg protege a las neuronas de sus efectos tóxicos [95]. Además, estudios preclínicos empleando neuronas obtenidas de ratas de 2 semanas de edad

1 muestran que la exposición a dosis bajas de timerosal (0.3-1 μ M) incrementa el Ca²⁺ extra
2 celular [96]. Se cree que este mecanismo está asociado a la liberación de glutamato de las
3 células, por lo que la toxicidad del timerosal podría deberse a la excitotoxicidad del glutamato
4 [91], (Figura 6). De igual forma, el timerosal es capaz de inducir muerte celular hasta del
5 40% en células neuronales y gliales, a una concentración de 4 μ M [97], y se sabe que
6 disminuye la migración de las células de la cresta neural [98]. En conjunto, esta evidencia
7 propone que la exposición de timerosal en etapas tempranas del neurodesarrollo puede
8 inducir alteraciones cognitivas que reproducen las identificadas en el TEA [83, 85, 86].



1

2

Figura 6. A) Asimilación de mercurio a partir de timerosal. A través de una reacción de sustitución, el etHg es transferido del timerosal hacia proteínas ricas en Cys, estas son transportadas a la circulación donde el Hg se transfiere a proteínas del plasma. Una vez que, se moviliza hacia tejidos como hígado y cerebro. **B) Mecanismo de excitotoxicidad mediado por mercurio.** El mercurio asimilado promueve la secreción de glutamato, activando los receptores NMDA en la possinapsis lo que incrementa el ingreso de calcio a la célula. El calcio captado promueve estrés del retículo endoplásmico y producción de especies reactivas de oxígeno en la neurona induciendo muerte celular. *Farina and Rocha, 2013.*

3

4

5

6

7

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

3.3 Alteraciones inmunológicas

La interacción del sistema inmune (SI) y el SNC favorece el desarrollo normal y preciso del cerebro. En particular, se sabe que la microglía, quién representa a la célula con función fagocítica del cerebro, modula de forma positiva la neurogénesis y facilita la plasticidad sináptica, además de ser la principal célula presentadora de antígeno (CPA) en el SNC [99, 100]. La comunicación entre el sistema inmune cerebral y periférico ocurre por dos vías principales: 1) Moléculas inflamatorias procedentes de la periferia pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) e integrarse al SNC, incluyendo los linfocitos B, T, macrófagos y anticuerpos [101], y 2) El nervio vago posee receptores para citocinas del tipo interleucina 1 (IL-1R), e integra macrófagos asociados que pueden responder a estímulos proinflamatorios [102]. En este nuevo ambiente, se favorece la secreción de citocinas en células de la microglía y astrocitos, estas a su vez, secretaran citocinas inflamatorias causando un fenómeno de retroalimentación positiva culminando en la estimulación del crecimiento y desarrollo neuronal [10].

A pesar de su importancia para el neurodesarrollo y mantenimiento de la homeostasis, la liberación crónica de señales inflamatorias promueve el desarrollo de enfermedades como el cáncer, la diabetes, y padecimientos neuropsiquiátricos [103–106]. Los orígenes o causas de las señales inflamatorias son variadas, en algunos casos, el perfil genético puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades, en otras circunstancias, factores externos como la contaminación, estrés y alteraciones endócrinas fungen como principales iniciadores de enfermedades relacionadas con inflamación [107]. A nivel molecular, factores como los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (lípidos de membrana y restos celulares), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (LPS y ácidos nucleicos de origen viral) pueden desencadenar una respuesta inflamatoria, al ejercer la heterodimerización de

1 los TLR1, TLR2 y la homodimerización de los TLR2, TLR3 y TLR4. Este proceso involucra
2 el reclutamiento de MyD88 y TBK1 hacia los TLR dimerizados, lo que induce la
3 fosforilación y posterior degradación de I κ B α , la subunidad inhibitoria de NF- κ B; de esta
4 manera RelA y P50, las subunidades con actividad de factor de transcripción de NF- κ B, se
5 translocan al núcleo iniciando la expresión de genes proinflamatorios como TNF- α , IL- β 1 e
6 IL-6 e interferones (INF γ) [106]. Adicionalmente, estímulos inflamatorios favorecen la
7 expresión de las proteínas que participan en la diapédesis de linfocitos B y T, como el
8 antígeno de activación tardía-4 (VLA-4), la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y
9 la molécula de adhesión celular del leucocito activado (ALCAM) [108]. En condiciones
10 patológicas, la isquemia cerebral y modelos de encefalitis autoinmune experimental, la
11 interacción linfocitos-microglía, permite la polarización de los primeros hacia el fenotipo
12 Th1, en este estado secretan citocinas inflamatorias (TNF- α) e interferón del tipo 1 (INF- γ)
13 desencadenando así un proceso inflamatorio de retroalimentación positivo que altera de
14 forma negativa la función del SNC [106]. Evidencia acumulada reporta que la
15 neuroinflamación favorece la neurodegeneración independiente de la activación de apoptosis
16 [109]. Sumado a lo anterior, se ha demostrado que la proteína quimioatrayente de macrófagos
17 (MCP-1), quimiocina identificada en el plasma de sujetos con TEA [110, 111], participa en
18 el deterioro de la conducta social [112]. De manera notable, quizá el reporte más sobresaliente
19 que demuestra la importancia de la activación del sistema inmune durante en desarrollo
20 embrionario en el desarrollo de TEA se documentó por Kim et al, 2017. Los autores
21 demostraron que la exposición perinatal a un análogo de RNA viral y LPS favorece la
22 diferenciación de linfocitos T hacia el linaje Th17 el cual, a través de la citocina IL-17A y
23 promueve el desarrollo de un comportamiento parecido al autismo en ratones [13].

24 Por lo anterior, los desbalances en el SI pueden repercutir de forma negativa en el
25 desarrollo y función del cerebro, favoreciendo daño cognitivo y la aparición de trastornos del

1 comportamiento como el TEA. Diversas investigaciones han corroborado esta propuesta y
2 demostrado que la presencia de infecciones durante el embarazo incrementan el riesgo de
3 desarrollar desórdenes neurológicos en su descendencia, confirmando la hipótesis de que
4 eventos proinflamatorios durante el embarazo inducirán crecimiento neuronal aberrante y
5 alteraciones en la neuroplasticidad del feto, predisponiéndolo a enfermedades psiquiátricas
6 [10]. Por ejemplo, estudios en modelos animales han identificado que estímulos
7 proinflamatorios durante el embarazo incrementan la cantidad de espinas dendríticas en el
8 hipocampo de ratones macho, a la par que disminuyen el receptor de membrana CX3CR1
9 en las células de la microglía [113], receptor que funge como regulador de la respuesta
10 inflamatoria y fagocitosis en este tipo celular [114]. Además, la microglía y astrocitos se han
11 encontrado activados en el cerebelo y CPF de pacientes con autismo (Fatemi et al. 2012)
12 (Edmonson, Ziats, and Rennert 2014). A pesar de los cambios estructurales y anatómicos, así
13 como las alteraciones en las poblaciones neuronales reportadas en el desarrollo de TEA, se
14 desconoce el efecto producido por las células del SI en la función del SNC como moduladores
15 de la función cerebral en un sujeto autista. Este tema lo abordaremos a continuación.

16

17 ***3.3.1 Inflamación perinatal como un factor de riesgo en el desarrollo del TEA***

18 ***3.3.1.1 Infección viral***

19 En condiciones de infección viral durante el embarazo, el riesgo de transmitir dicha
20 infección hacia el feto representa uno de los mayores temores en los sujetos. La transmisión
21 de la infección viral madre-feto ha sido demostrada para el virus de inmunodeficiencia
22 humana (VIH) [115], virus de hepatitis B (VHB) [116], citomegalovirus humano (CMVH)
23 [117] y algunos virus de la familia de los arbovirus como el zika, Chikungunya y dengue
24 [118]. De interés, evidencia experimental ha documentado que el desarrollo del embrión

1 puede afectarse por estímulos alternativos que fomenten un perfil proinflamatorio, los cuales
2 son independientes de alguna infección viral [4, 13–15]. Por ejemplo, estudios preclínicos
3 demuestran que la administración del fármaco análogo al ARN viral, el ácido poliinosínico-
4 policitidílico (Poly I:C) y lipopolisacárido (LPS), a ratas Wistar embarazadas inducen el
5 incremento de las citocinas proinflamatorias IL-2, IL-5, IL-7 e IL-13, agentes
6 quimioatrayentes (MCP1), además de IL-1 β e IL-6, y la proliferación y maduración de
7 linfocitos y del receptor metabotrópico mGluR5, en suero y cerebro de su descendencia, las
8 cuales correlacionan con defectos conductuales tales como, el reflejo de agarre y
9 enderezamiento, así como en la geotaxia [14, 15]. Actualmente se ha demostrado que la
10 administración de Poly (I:C) a ratas Wistar durante el embarazo favorece rasgos conductuales
11 y alteraciones en regiones del cerebro que reproducen una conducta similar al autismo [4].
12 Se propone que este fenómeno podría ser mediado por la secreción de IL-17A por los
13 linfocitos T cooperadores (T_h17) y bacterias filamentosas del tracto intestinal [13].
14 Molecularmente, el mecanismo por cual el Poly (I:C) induce la respuesta inflamatoria es
15 mediante la activación de las vías TLR3/TBK1/IRF3-7 y TLR3/IKK/NF- κ B; similar a lo que
16 sucede durante una infección viral. Estas evidencias preclínicas en modelos animales
17 proponen de forma certera, que las alteraciones cognitivas y conductuales presentes en los
18 infantes con TEA, pueden estar relacionadas con una respuesta inflamatoria exacerbada
19 durante su neurodesarrollo [14, 15].

20 Aunque no ha sido completamente confirmado, la inflamación prenatal podría afectar
21 el neurodesarrollo del producto y favorecer alteraciones conductuales posterior al
22 nacimiento. Estudios han demostrado que el líquido amniótico de mujeres que padecieron
23 infecciones intrauterinas durante el embarazo presenta disminución de las citocinas
24 antiinflamatorias IL-10, IL-4 y TGF- β , e incremento de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-
25 6 y TNF- α en el cerebro del feto y de la madre [119]. De manera similar, se identificó que

1 los hijos de mujeres con una titulación alta de anticuerpos contra el virus del herpes,
2 mostraban un riesgo del 2.07% de padecer TEA [12]. Con todo lo anterior proponemos que
3 la producción de citocinas proinflamatorias a través de la vía TLR3 durante el embarazo es
4 un factor de riesgo para el desarrollo de TEA en la progenie.

5 3.3.1.2. Infección bacteriana

6 Desde el momento de nuestro nacimiento estamos expuestos a microorganismos que
7 infectan nuestro intestino, sin embargo, su presencia no produce respuestas del SI exacerbada
8 debido a que por miles de años el proceso evolutivo nos permitió adaptarnos y coexistir de
9 forma simbiótica con estas especies [120]. De hecho, la presencia de microorganismos tienen
10 una gran influencia en la función fisiológica de los individuos, incluyendo el desarrollo de la
11 barrera epitelial, homeostasis intestinal, angiogénesis, en la función del sistema inmune
12 innato y adaptativo, y en la función hepática [121–124]. De nuestro interés, también se sabe
13 que la presencia de un tipo selectivo de microbioma participa en el desarrollo de los circuitos
14 neuronales relacionados con el control motriz y ansiedad [125]. Con ello, alteraciones en el
15 ecosistema bacteriano o especies que colonizan a los individuos pueden repercutir de forma
16 negativa en el desarrollo neural de un infante. Por ejemplo, en un estudio que incluyó a
17 madres que sufrieron dos o más infecciones bacterianas en las vías urinarias, durante el
18 segundo y tercer trimestre del embarazo, se documentó 1.71% de riesgo de dar a luz a un
19 infante con TEA, si la infección fue en el segundo trimestre [126]. Además, la presencia de
20 problemas gastro intestinales han sido asociados con el desarrollo del TEA, siendo las
21 bacterias del género *Prevotella* las más comunes en niños con TEA donde se sugiere que la
22 dieta puede ser un factor selectivo en las poblaciones bacterianas que residen en el tracto
23 intestinal [127, 128], Además, los problemas intestinales son independientes de la flora
24 heredada por los padres ya que hermanos del sujeto con TEA no presentan estos problemas
25 [129].

1 Finalmente, la inoculación de LPS a ratones hembra C57BL/6, un componente de la
2 pared celular bacteriana, en la segunda mitad de la gestación, es capaz de inducir
3 vocalizaciones más cortas y un grado bajo de socialización en la descendencia murina. En
4 este mismo modelo se observó que las hembras mostraron un comportamiento repetitivo,
5 característico del TEA, mientras que los machos mostraron una disminución en el mRNA de
6 CX3CR1 en células de la microglía y un mayor número de espinas dendríticas en el
7 hipocampo, comparándolos con el grupo control [113]. La proteína de membrana CX3CR1
8 es una molécula que, al interactuar con su ligando (CX3CL1), disminuye la secreción de
9 citocinas inflamatorias y la fagocitosis en células de la microglía [114]. Esto es muy relevante
10 ya que, las citocinas han sido implicadas en el modelamiento sináptico en el hipocampo
11 [130], por lo que la ausencia de CX3CR1 en células de la microglía, puede llevar a la
12 producción aberrante de citocinas inflamatorias [131] culminando en alteraciones en el
13 hipocampo y, por consiguiente, favorecer alteraciones en el comportamiento de su
14 descendencia. Recientemente, se reportó que la presencia de ciertas bacterias filamentosas
15 en el intestino predispone a la descendencia a padecer TEA, ya que estas bacterias
16 sensibilizan a los linfocitos T_h17 los cuales, en presencia de un segundo estímulo inflamatorio
17 secretaran IL-17A, fomentando el desarrollo de trastorno neurológicos [13, 132]. Todas estas
18 evidencias experimentales nos sugieren que la exposición a ciertas especies bacterianas
19 durante el embarazo puede desencadenar una cascada inflamatoria afectando el desarrollo
20 neuronal de los infantes y favoreciendo la aparición de TEA.

21

22

23

1 3.3.1.3 *Inflamación metabólica*

2 La obesidad se caracteriza por un estado de inflamación crónica de bajo grado que se
3 favorece por la acumulación e incremento en la cantidad de triacilglicéridos almacenados en
4 el tejido adiposo blanco. Se sabe que los ácidos grasos de la dieta interactúan con los
5 receptores tipo toll (TLR)-4 en diversos tipos celulares del cuerpo, fenómeno denominado
6 inflamación metabólica o “metainflamacion” [133, 134]. Amplia evidencia ha demostrado
7 que la inflamación crónica durante la obesidad no se limita a órganos periféricos, sino que
8 invade fronteras más lejanas y puede detectarse en el SNC. Esta respuesta inflamatoria puede
9 originarse por el reclutamiento de células periféricas del sistema inmune hacia el SNC
10 promoviendo la generación de inflamación [135], y de hecho, se ha documentado que este
11 evento puede suceder antes de observar cualquier signo de inflamación en la periferia [136,
12 137]. Como se mencionó anteriormente, la inflamación metabólica en el SNC involucra una
13 serie de eventos muy complejos donde primero se observa la activación de células de la
14 microglía a través de sus TLR (TLR4, TLR1 y TLR2) lo que permite la secreción de la
15 citocina inflamatoria IL-1 β , la cual activa a los astrocitos presentes en el epitelio vascular de
16 núcleos circunventriculares, como el plexo coroideo, de esta manera se secretan moléculas
17 quimioatrayentes de linfocitos B, T y macrófagos [106].

18 Por su parte, en respuesta a una dieta alta en grasas los linfocitos B son capaces de
19 producir un anticuerpo patogénico de clase IgG1 el cual fomenta la polarización de los
20 macrófagos y microglía hacia el fenotipo proinflamatorio M1 [138, 139], disminuyendo la
21 formación de memoria espacial, que se creó se asocia a la activación de un proceso de “poda”
22 sináptica causado por la microglía [140]. Por último, las células de la microglía en presencia
23 de un ambiente rico en ácidos grasos activa una respuesta inflamatoria dependiente de la vía
24 TLR4/IKK/NF- κ B [133, 141] alterando de forma negativa la consolidación de memoria y
25 aprendizaje, así como la respuesta del SNC hacia hormonas reguladoras de la homeostasis

1 energética [114, 140, 142]. De interés, se ha documentado que padecer obesidad y sobrepeso
2 durante la gestación incrementa en 1.54% el riesgo para presentar el TEA en el producto
3 [10, 16, 17].

4 Trabajos previos de nuestro grupo, proponen a la vía TLR4/TBK-1/NF- κ B como un
5 mediador de la respuesta inflamatoria por células de la microglía en el SNC [143]. Sumado
6 a lo anterior, se conoce que en los modelos de TEA inducido por inflamación perinatal, se
7 emplean la molécula LPS, molécula que activa a NF- κ B a través de la vía del TLR4 [144],
8 y Poly (I:C), molécula que desencadena la secreción de interferón tipo 1 y producción de
9 IFIT por la vía TLR3/TBK-1/IRF [145]. Lo anterior sugiere que los ácidos grasos de la dieta
10 puedan inducir la activación de la vía inflamatoria TLR4/TBK-1/IRF favoreciendo el
11 desarrollo de TEA. De interés, nuestro grupo de investigación identificó que la programación
12 fetal inducida por la ingesta de comida hipercalórica durante el embarazo y lactancia
13 predispone a la descendencia a una conducta parecida a la adicción [146–148], además de
14 incrementar la expresión de genes del sistema inmune en el núcleo accumbens, como NFAT5
15 e IFIT1 (Montalvo-Martínez, et al, no publicado). Se sabe que estas moléculas participan en
16 la maduración de linfocitos B y producción de citocinas en células T [149] e inducen la
17 respuesta inmune contra virus como el citomegalovirus (CMV) y virus de la hepatitis B
18 (VHB) [150, 151], respectivamente. Con base en estas evidencias se propone que la presencia
19 de neuroinflamación asociada a infección viral durante el embarazo es un factor de riesgo
20 para el desarrollo del TEA (Arrode-Brusés and Brusés 2012; Dammann and Leviton 1997;
21 Fernández de Cossío et al. 2017; Mahic et al. 2017). Por lo anterior, la presencia de genes
22 sobreexpresados en un modelo de programación fetal por dieta, fortalece la idea de que la
23 exposición perinatal a una hiperlipidemia puede ser un factor de riesgo para desarrollar TEA
24 (Figura 7).

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

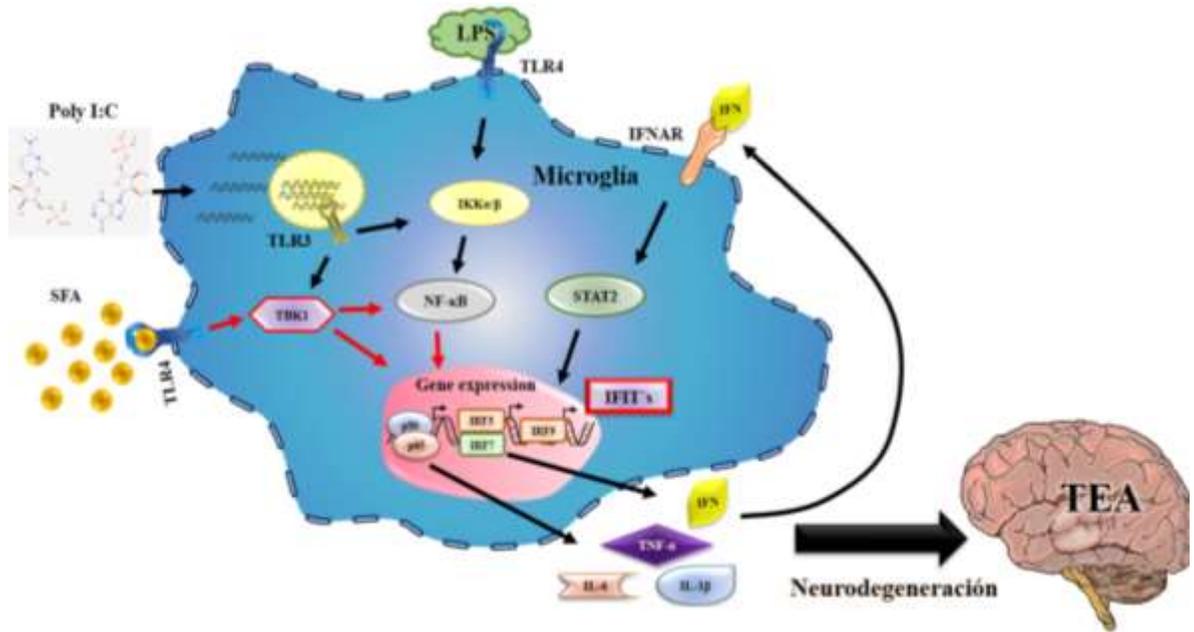


Figura 7. Convergencia de los mecanismos inflamatorios involucrados en autismo. El TLR4 reconoce tanto al LPS como ácidos grasos de la dieta, quienes activan la vía TBK1/NF-κB, promoviendo la secreción de citocinas proinflamatorias relacionadas con el autismo. Por su lado, el Poly I:C, es reconocido por el TLR3, desencadenando la vía del interferón, mediada por TBK1/IRF3/IRF7. De esta manera se secreta interferón de tipo 1, el cual interactúa con su receptor, permitiendo así, la expresión de IFIT, proteína que se encontró sobre-expresada en un modelo de reprogramación fetal por dieta.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

III. JUSTIFICACIÓN

El autismo es una enfermedad que afecta la capacidad de los individuos a integrarse en la sociedad, aunque su prevalencia se incrementa cada año, no se conocen con certeza las alteraciones moleculares y/o fisiológicas que dan lugar a su desarrollo. Proponemos que la presencia de un estado de inflamación crónica de bajo grado durante el embarazo por la exposición a fórmulas con alto contenido calórico, puede afectar la función y/o estructura cerebral del embrión en desarrollo y favorecer la aparición del TEA posterior al nacimiento.

Con base en esta información, es prioritario identificar si la programación fetal por exposición a dieta con alto contenido calórico induce neuroinflamación y cambio estructural en las regiones del SNC involucradas en el desarrollo de la conducta parecida al autismo en la descendencia. Esta caracterización nos permitirá identificar blancos moleculares con potencial terapéutico y/o control de la conducta aberrante.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

IV. HIPÓTESIS

La exposición a dieta con alto valor calórico durante el embarazo induce neuroinflamación y cambios de volumen en regiones cerebrales relacionadas con la conducta parecida al autismo en la descendencia.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Caracterizar el efecto de la exposición perinatal a una dieta con alto valor calórico en el perfil inflamatorio y los cambios de volumen de regiones cerebrales vinculadas al desarrollo de la conducta parecida al autismo en un modelo murino.

1.1 Objetivos Específicos

1. Identificar la conducta parecida al autismo en la descendencia de ratones hembra expuestas a dieta con alto valor calórico.
2. Identificar las zonas del cerebro que presenten cambios estructurales en ratones programados por dieta con alto valor calórico.
3. Identificar el perfil de citocinas proinflamatorias periféricas y en las regiones cerebrales de la descendencia de sujetos del objetivo anterior.
4. Comprobar si la modulación del perfil inflamatorio revierte las alteraciones estructurales en el SNC y la conducta similar al autismo en la descendencia de sujetos expuestos a dieta con alto valor calórico.

1

2

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

3

i. Material biológico

5

Para realizar todos los procedimientos experimentales se emplearon ratones de la cepa C57BL6 de 2 a 3 meses de edad. Todos los animales se mantuvieron en el Bioterio del Centro de Investigación y Desarrollo de la UANL, en ciclos de luz/oscuridad de 12 h con acceso a comida y agua *ad libitum*. El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL y Hospital Universitario “José Eleuterio González” con la clave BI12-001.

11

ii. Materiales y reactivos

Tabla 2. Materiales y reactivos

Reactivo	No. Cat.	Aplicación	Concentración	Proveedor
Ácido polinosínico: policitidílico (Poly I:C)	P1530	Programación fetal por MIA	20 mg/kg	Sigma Alrich, Misuri, USA
Albúmina sérica bovina	sc-2323	Preparación de anticuerpos	10%	Santa Cruz Biotechnolog, Texas, USA
Pentobarbital sódico	Q-7833-215	Sacrificio	150 mg/kg	PISA Agropecuaria, Jalisco, México
kit MILLIPLEX MAP Kit Mouse Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel	MCYTOMA G-70K	Cuantificación de citocinas	N/A	Milli-pore corporation, Massachusetts, USA
Paraformaldehído	P6148	Perfusión intracardiaca	4%	Sigma Alrich, Misuri, USA
ProHance Gadoteridol 0.5M	0270-1111- 70	Perfusión intracardiaca/MRI	4mM	BRACCO, Germany
Buffer de fosfatos	P4417- 100TAB	Perfusión intracardiaca	1M	Sigma Alrich, Misuri, USA
Anticuerpo isotipo IgG (rata)	400402	Ensayos de neutralización de MCP-1	1.6µg/100µL o 8µg/100µL	BioLegend, California, USA
Anti-Iba1 (conejo)	ab178846	Inmunohistoquímica	1:2,000	abcam, Cambridge, MA, USA

Anti-HRP de conejo (bovino)	sc-2370	Inmunohistoquímica	1:1,000	Santa Cruz Biotechnolog, Texas, USA
Anti-MCP1 (conejo)	ab25124	Ensayos de neutralización de MCP-1	1.6µg/100µL o 8µg/100µL	abcam, Cambridge, MA, USA
Anti-HRP de ratón (bovino)	7076S	Inmunohistoquímica	1:2,000	Cell Signaling, Massachusetts, USA

1

2 **iii. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

3

4 **1. Modelos de programación fetal**

5

6 **1.1. Programación con dieta control**

7

8 Se emplearon hembras de la cepa C57BL6 de 3 meses de edad que fueron apareadas
9 con machos de 3 meses de la misma cepa. Las hembras madre y sus crías se mantuvieron con
10 dieta estándar y agua *ad libitum*. Cuando las crías cumplieron 23 días de edad, se destetaron
11 y fueron separadas de acuerdo con el sexo, colocando 3 ratones por jaula. Los roedores se
12 mantuvieron con agua y comida estándar *ad libitum* hasta cumplir los 2 meses de edad,
13 tiempo al que se realizaron las pruebas (Figura 8A).

14

15

16

17

18

19

1 ***1.2.Programación fetal por activación inmune materna***

2

3 Se empleó un nuevo grupo de ratones hembra vírgenes de 3 meses de edad (n = 10)
4 de la cepa C57BL6 que fueron cruzados con machos vírgenes de la misma edad. La copula
5 se determinó mediante la presencia del tapón vaginal que se tomó como el día de gestación
6 E0.5. A los 12.5 días de gestación se administró una dosis de 20 mg/kg de ácido polinosínico:
7 policitidílico (Poly I:C) por vía intraperitoneal. Después de la inyección, la hembra se dejó
8 sin perturbar hasta el momento del destete de las crías (día 23 postnatal). La descendencia se
9 separó de acuerdo con el sexo, colocando un máximo de 3 ratones por jaula. Los roedores se
10 mantuvieron con alimento estándar y agua *ad libitum* hasta los 2 meses, tiempo al que se
11 realizaron las pruebas conductuales (Figura 8B).

12

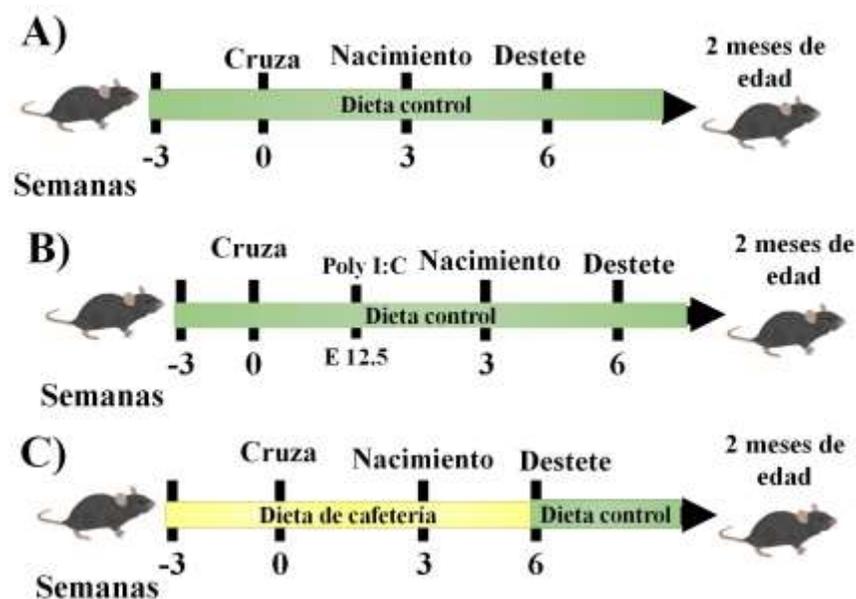


Figura 8. Modelos de programación fetal. A) Condiciones de crianza del grupo control. B) Modelo de programación por activación inmune materna inducida por Poly I:C. C) Modelo de programación fetal por dieta alta en grasas y azúcares (cafetería). D) Esquema de tratamiento con anticuerpo neutralizante anti MCP-1 a una concentración de 1.6 μ g por 5 días o solución salina en el grupo control y cafetería. E) Esquema de tratamiento con anticuerpo neutralizante anti MCP-1 a una concentración de 8 μ g por 3 días o anticuerpo isotipo IgG en el grupo control y cafetería.

1.3. Programación con dieta de cafetería

1. Hembras de 2 meses y 1 semana de edad fueron alimentadas con dieta de cafetería (CAF) *ad libitum* por 3 semanas, hasta cumplir los 3 meses de edad. Al cumplir los 3 meses se inició la cruce con machos vírgenes de la misma edad y las hembras se mantuvieron alimentadas con la dieta CAF durante la gestación (3 semanas) y lactancia (3 semanas). La composición de la dieta se especifica en la Tabla 3.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Tabla 3. Composición de la dieta de cafetería

<i>Dieta de cafetería</i>	
Galletas Marías	250 g
Papitas “Sabritas Original”	250 g
Chocolate líquido Hershey’s	250 g
Tocino Fud	250 g
Pate de cerdo swan	500 g
Polvo de pellets de comida estándar	250 g

**372 kcal/100 g distribuidos en 39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas*

2. Al día 23 después del nacimiento, las crías se destetaron y se separaron de acuerdo con el sexo, colocando 3 ratones por jaula. Los ratones se mantuvieron con alimento estándar y agua ad libitum hasta los 2 meses, tiempo al que se realizaron las pruebas conductuales (Figura 8C).

2. Ensayo de neutralización de MCP-1

En este ensayo se realizaron 2 experimentos independientes 1) la neutralización de MCP-1 administrando 1.6 µg/100 µL/ratón/5 días, y 2) 8 µg/100 µL/ratón/3 días.

Para este ensayo se emplearon ratones macho de los grupos de programación con dieta control y con dieta de cafetería. El esquema de tratamiento se detalla en la Figura 9. Se escogieron de forma aleatoria 15 ratones macho del grupo de programación por dieta control y 15 ratones del grupo de dieta de CAF. Los ratones se dividieron en 3 subgrupos de 5 ratones de 2 meses de edad/subgrupo, administrados de acuerdo con el siguiente tratamiento.

1

2 **Experimento 1:**

3 1. Grupo control. Se emplearon 5 ratones programados con dieta control y 5
4 ratones con dieta CAF, aislados en jaulas individuales con agua y comida *ad libitum* hasta el
5 inicio de las pruebas conductuales.

6 2. Grupo solución salina. Se emplearon 5 ratones programados con dieta control
7 y 5 con dieta CAF y fueron administrados con 100 μ L de solución salina inyectable. Las
8 inyecciones iniciaron 2 días previos a las pruebas conductuales y continuaron durante los 3
9 días en que se llevaron a cabo, dando un total de 5 días de administración.

10 3. Grupo anticuerpo. Se emplearon 5 ratones programados con dieta control y 5
11 con dieta CAF fueron administrados con 1.6 μ g del anticuerpo neutralizante contra MCP-1
12 en 100 μ L de solución salina inyectable, las inyecciones se comenzaron 2 días antes de iniciar
13 las pruebas conductuales y continuaron durante los 3 días en que se llevaron a cabo, dando
14 un total de 5 días de administración.

15 4. Grupo anticuerpo neutralizante contra MCP-1. Se emplearon 5 ratones
16 programados con dieta control y 5 con dieta CAF, ambos grupos (solución salina y anticuerpo
17 neutralizante contra MCP-1). Las inyecciones se realizaron 30 minutos antes de las pruebas
18 conductuales.

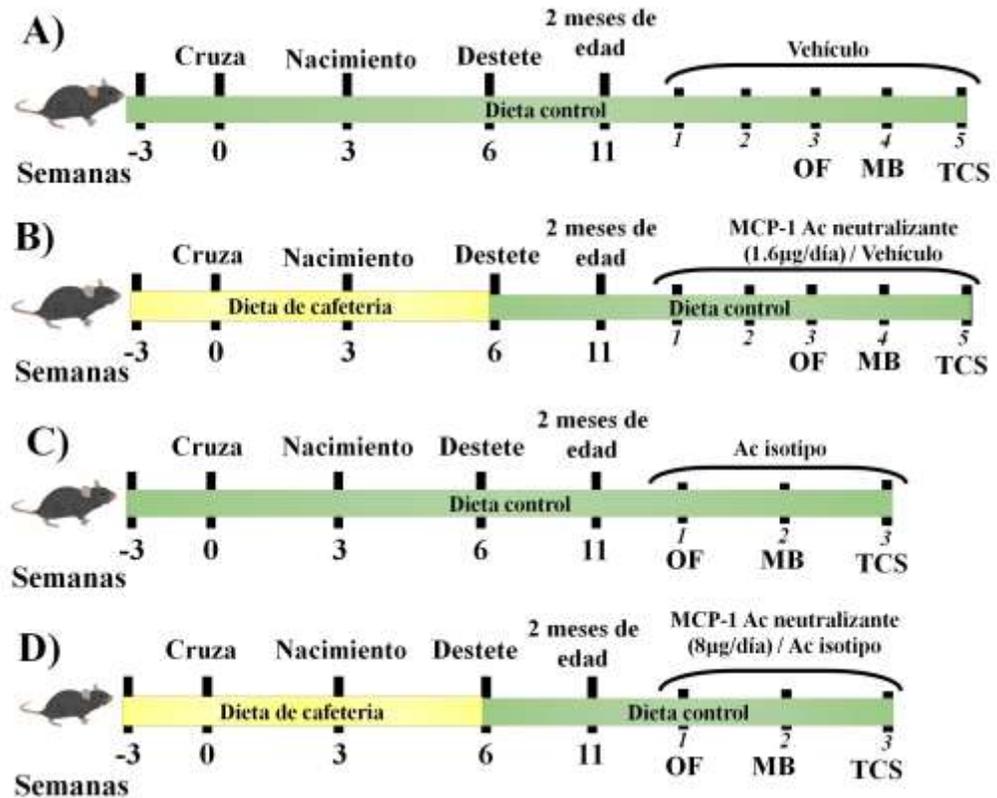
19

20 **Experimento 2:**

21 Se escogieron de forma aleatoria 16 ratones macho del grupo de programación por
22 dieta control y se dividieron en 2 subgrupos de 8 ratones. Además, se escogieron 12 ratones
23 expuestos a dieta de cafetería y se subdividieron en 2 grupos de 8 y 4 ratones,

1 respectivamente. Se administró $8\mu\text{g}/3$ días de anticuerpo neutralizante contra MCP-1 o
2 anticuerpo isotipo IgG, como se detalla en la figura 9C y 9D. Las inyecciones se realizaron
3 30 minutos antes de las pruebas conductuales.

4



5

Figura 9. Ensayo de neutralización de MCP1 en los modelos de programación fetal. **A)** Esquema de tratamiento con solución salina por 5 días en el grupo control. **B)** Esquema de tratamiento con anticuerpo neutralizante anti MCP-1 a una concentración de $1.6\mu\text{g}$ por 5 días o solución salina en el grupo cafetería. **C)** Esquema de tratamiento con anticuerpo isotipo IgG a una concentración de $8\mu\text{g}$ por 3 días en el grupo control. **D)** Esquema de tratamiento con anticuerpo neutralizante anti MCP-1 a una concentración de $8\mu\text{g}$ por 3 días o anticuerpo isotipo IgG en el de cafetería.

6

7

8

1 **3. Pruebas conductuales para evaluación de conducta parecida al autismo**

2

3 Las pruebas conductuales fueron realizadas en la unidad de Neurometabolismo del
4 Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL.

5 Los roedores de la descendencia macho y hembra fueron transportados al sitio de la
6 prueba 30 minutos antes de iniciar los análisis conductuales, con la finalidad de que se
7 aclimataran al sitio. Cada una de las pruebas se realizó con un día de separación entre grupos.

8

9 **3.1. Prueba de sociabilidad en 3 cámaras**

10

11 Una semana antes de iniciar la prueba, los ratones “desconocidos” fueron habituados
12 a la arena de 3 cámaras, esto se realizó al encerrar a los ratones en jaulas cilíndricas y
13 colocarlos dentro de una de las cámaras laterales de la arena por 10 minutos, este
14 procedimiento se realizó por los siguientes 7 días.

15 1. Esta prueba se llevó a cabo empleando una arena de tres cámaras como se
16 describe en la figura 10 e incluye tres fases: 1) fase de habituación, 2) fase de exploración,
17 3) fase de socialización.

18 2. Durante la fase de habituación, los ratones se colocan en la cámara central de
19 la arena con las puertas laterales cerradas durante 10 minutos (Figura 10A)

20 3. En la fase de exploración, se abrieron las puertas laterales y se le permitió al
21 ratón recorrer la arena libremente por 10 minutos. Al pasar este tiempo el ratón fue confinado
22 en la cámara central para iniciar la fase de socialización (Figura 10B). Se cuantificó el tiempo
23 que el roedor paso en cada una de las cámaras laterales, a ese valor se le denominó “tiempo
24 de exploración”

1 **3.2.Prueba de entierro de canicas**

2

3 1. Esta prueba se llevó a cabo en jaulas idénticas en material y dimensiones a las
4 que habitaron los sujetos experimentales. Las jaulas se cubrieron con 5 cm de aserrín limpio
5 en donde se colocaron canicas estándar (15 mm de diámetro y 5.2 g de peso) dispuestas en 4
6 filas de 4 canicas cada una, separadas equitativamente unas de otras (Figura 10D).

7 2. Se colocó al ratón en una esquina lo más alejada posible de las canicas y se
8 cerró la jaula con tapas de cartón liso. Se le permitió al sujeto interactuar con las canicas por
9 30 min y se cuantificó el número de canicas enterradas con aserrín en dos tercios de su
10 superficie. Se graficó el porcentaje de canicas enterradas.

11

12 **3.3.Prueba de campo abierto**

13

14 1. El roedor fue colocado en el interior del recinto, permitiéndosele recorrer la
15 arena por 10 min. Toda la prueba fue grabada.

16 2. Al finalizar cada sesión se retiró al roedor y la arena se limpió con etanol al
17 70% antes de comenzar la prueba del siguiente sujeto.

18 3. Los videos se analizaron con el software *OA VidReg OmniAlva*®. Se graficó
19 el tiempo pasado en la zona central y en la zona externa (segundos), así como la distancia
20 total recorrida (metros) y el porcentaje de actividad (Figura 10E).

21

22

4. *Resonancia magnética nuclear basada en deformación (RMNM)*

4.1. *Perfusión cardiaca*

1. Los ratones macho, fueron sacrificados con sobredosis de Pentobarbital 150mg/kg en 150µL de solución salina vía intraperitoneal. Posteriormente se realizó una disección dérmica desde la región abdominal hasta la parte superior de la caja torácica, exponiendo el corazón.

2. Se perforó el ventrículo izquierdo del corazón siguiendo su vértice y se realizó un corte en la aurícula derecha, con el fin de abrir el sistema circulatorio. Se perfundió solución de lavado PBS 0.1 M + Heparina + PROhance (6 mM) empleando una bomba de perfusión (Fisher Scientific GP1000) a flujo de 1 mL/min.

3. Posteriormente, se cambió la solución de lavado por la solución fijadora que incluye al paraformaldehído (PFA) 4% en PBS 0.1 M + Prohance 60 mM durante 20 min, siguiendo el mismo flujo.

4. Se colectó el cerebro protegido por el cráneo del modelo y se removió la piel, la mandíbula inferior, las orejas y la punta de la nariz cartilaginosa.

5. Las muestras se almacenaron a 4°C en PFA al 4% Prohance 60 mM por 24 horas y posteriormente se cambió la solución a PBS 0.1 M con azida de sodio 0.02% hasta su posterior análisis en la resonancia. Las imágenes de resonancia magnética pueden adquirirse luego de 4 días y no más de 2.5 meses después de la fijación.

1 ***4.2 Obtención de imágenes de Resonancia Magnética Nuclear y su análisis por***
2 ***morfometría en base a deformación.***

3

4 En esta prueba empleamos los ratones del ensayo de neutralización de MCP-1 por 5 días.

5 1. Los cerebros de los modelos animales protegidos por el cráneo se colocaron
6 individualmente para su análisis en un cilindro transparente con fondo en punta con 35 mL
7 de Fomblin, un perfluoropoliéter (SIGMA-ALDRICH 317926-100G) que tiene un efecto
8 dieléctrico bajo y una señal de RM mínima, con lo que aumenta el contraste y elimina los
9 artefactos de susceptibilidad no deseados próximos a los límites del cerebro, Además, se
10 evitó la formación de burbujas en el interior.

11 2. Se introdujeron los cilindros en la bobina del resonador a 45 cm de distancia
12 de la entrada al centro del resonador y se alinearon con el cráneo en dirección al resonador.

13 3. Las imágenes de los cerebros se adquirieron usando resonador Bruker 7 T
14 Paravisión 6.0.1 system, donde la relación señal/ruido se llevó aproximadamente a 20
15 gastando una resolución mejorada, ya que es el valor que proporciona una compensación
16 óptima para el registro de la computadora.

17 4. Se posicionó el cráneo en el resonador mediante la rotación de la imagen
18 prediseñada se evaluó la homogeneidad del campo observando el contraste de la imagen. Se
19 obtuvieron las imágenes con tiempo de repetición (TR) / tiempo de eco (TE) = 100/2.5 ms,
20 matrix= 256 x 256, tiempo de escaneo = 52:11 minutos con campo de visión (FoV) 50x50,
21 TA= 12s 800 ms, FA= 30 con tamaño de vóxel de 0.19 mm³ de imágenes isotrópicas con
22 orientación sagital.

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

1

2 ***4.3 Preprocesamiento ponderado en T1 y procesamiento de imágenes.***

3

4

5 1. Las imágenes ponderadas en T1 se convirtieron de formato DICOM a MINC
6 para el preprocesamiento. Las imágenes T1 se preprocesaron utilizando una tubería de
7 preprocesamiento interna con el software Bpipe
8 (http://cobralab.ca/software/mincbeast_bpipe.html), que hace uso del kit de herramientas
9 MINC (<http://www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesSoftware/ServicesSoftwareMincToolKit>) y
10 Advanced Normalization Tools.

11 2. Se realizó la corrección de campo de polarización N4, registro lineal en el
12 espacio del Instituto de Neurología de Montreal usando herramientas de normalización
13 avanzadas, seguido de la transformación de nuevo a espacio nativo. Las imágenes se
14 ingresaron en el MiceBuildModel ([https://wiki.mouseimaging.ca/display/MICePub/MICe-](https://wiki.mouseimaging.ca/display/MICePub/MICe-build-model)
15 [build-model](https://wiki.mouseimaging.ca/display/MICePub/MICe-build-model)). MICE-build-model.pl es un paquete de software optimizado para realizar el
16 registro de imágenes en cerebros de ratones. El registro puede definirse como el ajuste de dos
17 o más imágenes a una imagen promedio. Las diferencias entre la imagen promedio y las
18 imágenes individuales nos permiten calcular las diferencias de medias entre 2 o más grupos
19 de ratones. Primero se creó un cerebro plantilla usando la media de todos los cerebros de
20 forma no lineal. Esta plantilla fue la usada para el MBD. Para el análisis, se creó una máscara
21 de cerebro a mano.

22

23

24

1 ***5. Determinación del perfil de citocinas proinflamatorias***

2

3 ***5.1. Colección de tejido fresco y análisis***

4 Posterior a las pruebas conductuales los ratones macho de los grupos programados con
5 dieta control (n=10), programados con Poly I:C (n=9) y programados con dieta de cafetería
6 (n=7) se sacrificaron y se recuperó el cerebro completo de cada individuo. Los cerebros se
7 almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se empleó el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y
8 Watson, se aislaron las regiones cerebrales de la corteza somatosensorial primaria y el lóbulo
9 10 del cerebelo. Las biopsias se mezclaron con 70 µL del buffer de lisis Multiplexing de la
10 compañía millipore, se sonicaron por 10 pulsos a una amplitud del 20% 3 pulsos/segundo a
11 4°C. Las muestras se centrifugaron a 5,000 g x 10 minutos a 4°C, se aisló el sobrenadante y
12 se cuantificó el perfil de citocinas empleando el kit MILLIPLEX MAP Kit Mouse Cytokine
13 / Chemokine Magnetic Bead Panel. El protocolo para la cuantificación se llevó a cabo
14 siguiendo el inserto incluido con el kit. Las lecturas se realizaron empleando el equipo
15 Luminex® 200™ Multiplexing Instrument.

16

17 ***5.2. Colección de plasma y análisis***

18 Posterior a las pruebas conductuales los ratones macho de los grupos programados
19 con dieta control (n=10), programados con Poly I:C (n=9) y programados con dieta de
20 cafetería (n=7) se sacrificaron y se colectaron 500µL de sangre en tubos BD Microtainer®
21 SST GEL. Las muestras se centrifugaron a 1,300g a 4°C x 10 minutos, se recuperó el plasma
22 y se diluyó 1:2 con el “buffer de trabajo” presente en kit MILLIPLEX MAP Kit Mouse
23 Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel. El protocolo para la cuantificación se llevó a

1 cabo siguiendo el inserto incluido con el kit. Las lecturas se realizaron empleando el equipo
2 Luminex® 200™ Multiplexing Instrument.

3

4 **6. Análisis histológico empleando inmunohistoquímica**

5

6 Los ratones macho de los grupos programados con dieta control administrados con
7 vehículo (n=5), o isotipo (n=5), y los ratones macho de los grupos programados con cafetería
8 administrados con isotipo (n=5) o anticuerpo MCP-1 (8µg/3 días) (n=5), fueron sometidos a
9 perfusión intracardiaca como se describió anteriormente. Los cerebros se extrajeron y fueron
10 incubados en concentraciones crecientes de sacarosa al 10%, 20% y 30% por 12h en cada
11 solución, se realizaron cortes de 30 micras empleando el criostato Leica Biosystems. Después
12 de esto, se realizaron cortes coronales de 18µm en las coordenadas estereotáxicas AP: + 0.3,
13 ML: - 1.3 Dv: + 1.2, correspondientes a la corteza somatosensorial primaria (SSP), los cortes
14 fueron capturados en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y sometidos al proceso de
15 Inmunotinción:

- 16 1. 24h después de los cortes fueran capturados en los portaobjetos, las muestras
17 fueron pretratadas con una solución para la recuperación de antígenos (buffer de
18 citratos 10mM, pH 6) por 5 minutos. Finalizado este tiempo los cortes se lavaron
19 3 veces con PBS 1X por 5 minutos.
- 20 2. Los cortes se incubaron en una solución para permeabilizar la membrana celular
21 (PBS 1X, tritón X-100 0.3% y H₂O₂ 0.3%) por 15 minutos. Se realizaron lavados
22 de forma similar al punto 1.
- 23 3. Cada laminilla fue incubada por 45 minutos en la solución de bloqueo
24 Background Sniper (Biocare Medical). Las muestras se lavaron como en el punto
25 1 y posteriormente se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo contra la

1 molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1) a una dilución de 1:200
2 por 48h a 4°C. se realizaron lavados.

3 4. Inmediatamente después de terminar los lavados, los cortes se incubaron por 1h a
4 37°C en el reactivo Trekkie Universal Link, se realizaron lavados y
5 posteriormente se incubaron con el reactivo TrekAvidin-HRP por 1h.

6 5. Después de esto, los cortes fueron revelados empleando 3.3-diaminobencidina,
7 posteriormente se deshidrataron y fueron observados en el microscopio
8 Brightfield (Leica Microsystem).

9

10 Las microfotografías fueron tomadas con los objetivos 20X y 40X (2 cortes por
11 ratón). Para realizar la cuantificación del número total de células Iba1 positivas, número de
12 ramificaciones dendríticas y número de terminaciones dendríticas, se emplearon entre 50 y
13 60 células por grupo empleando los plugins “cell counter” y “Analyze skeleton (2D/3D)”,
14 respectivamente, del software ImageJ (National Institute of Health).

15

16 **7. Análisis estadístico**

17 Todos los análisis estadísticos, incluida la prueba de la normalidad de la distribución
18 de datos, se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.01 y el software de
19 estadísticas IBM SPSS versión 22 y se consideró significativo un valor de p corregido <0,05.

20 Se probó la normalidad de todos los resultados mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las
21 diferencias entre 3 grupos en las pruebas de comportamiento y la concentración de citocinas
22 se utilizó ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para
23 las diferencias significativas en la sociabilidad durante la determinación del fenotipo de
24 comportamiento, los datos se muestran como la media \pm EE y las diferencias significativas p
25 <0,05. El análisis estadístico sobre resonancia magnética basada en deformación se realizó

1 utilizando los determinantes jacobianos transformados logarítmicamente como variable
2 dependiente, "grupo" como variable independiente (entre sujetos) y como covariable
3 incluimos "orden por lotes" (los ratones fueron entrenados en lotes). Comparamos los 3
4 grupos usando un GLM y los análisis se corrigieron para comparaciones múltiples usando la
5 Tasa de Descubrimiento Falso (FDR) al 5% (42).

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

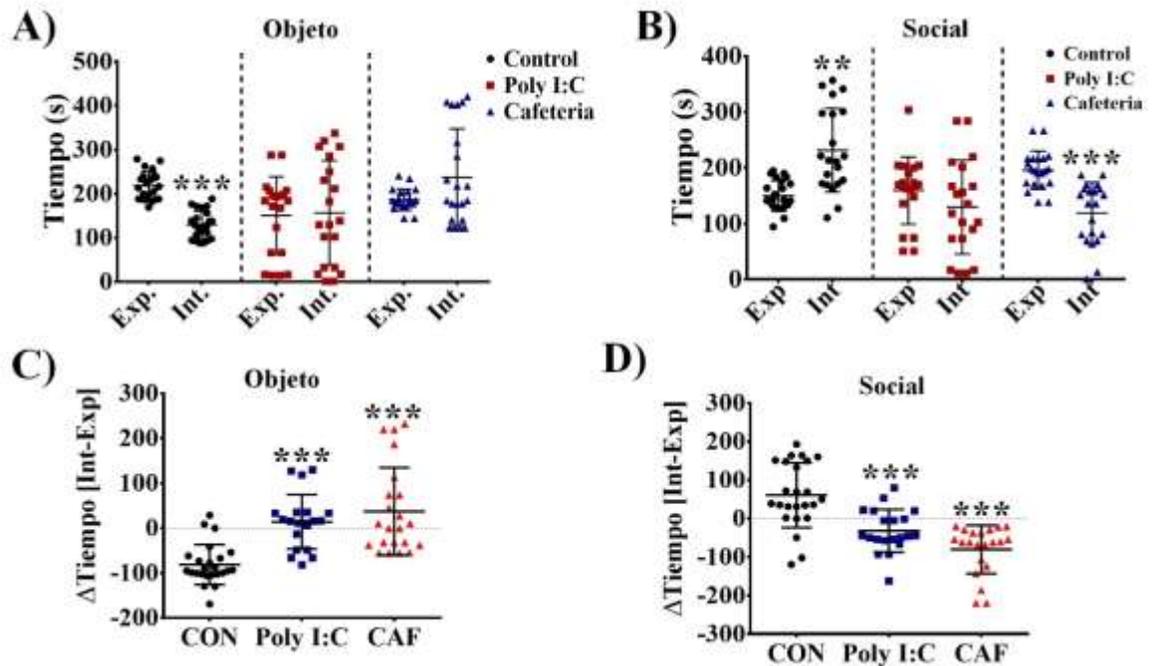
24

VII. RESULTADOS

Efecto conductual de la exposición a agentes proinflamatorios durante la gestación y lactancia

La primera parte de este proyecto consistió en demostrar que la alimentación con una dieta alta en grasa y azúcar durante el embarazo y la lactancia, promueve conductas aberrantes asociadas con el TEA en la descendencia. Para este objetivo empleamos un modelo de programación nutricional previamente publicado en nuestro grupo de trabajo [152]. Se expuso a ratones hembra de la cepa C57BL6 a una dieta hipercalórica durante 3 semanas previas al apareamiento, las 3 semanas de gestación y 3 de lactancia, y como control positivo se utilizó un modelo de activación inmune materna con Poly I:C, como se describe en la literatura [4]. La caracterización conductual a la edad de 2 meses de la descendencia de ratones se determinó usando la prueba de sociabilidad de 3 cámaras. En esta prueba se espera que un individuo sano exhiba mayor tiempo de interacción con el sujeto desconocido (ratón) en comparación con el objeto inanimado (figura de plástico). Nuestros resultados indican que los ratones macho del grupo control muestran incremento en el tiempo de interacción con el ratón desconocido, mientras que se observa reducción del tiempo con el objeto inanimado (Figura 11 A y B). Por su parte, la descendencia del grupo de machos expuestos a programación con Poly I:C, no presentan cambios en el tiempo de interacción con el ratón desconocido, ni con el objeto inanimado (Figura 11 A y B). Finalmente, la descendencia de machos programados con dieta CAF presentan menor tiempo de interacción con el sujeto desconocido, sin afectarse su interacción con el objeto inanimado (Figura 11 A y B). Al analizar el grado de interacción con el objeto inanimado, identificamos que los grupos Poly I:C y CAF poseen un mayor grado de interacción con el objeto inanimado en comparación con el control (Figura 11C), y exhiben un menor grado de interacción con el ratón

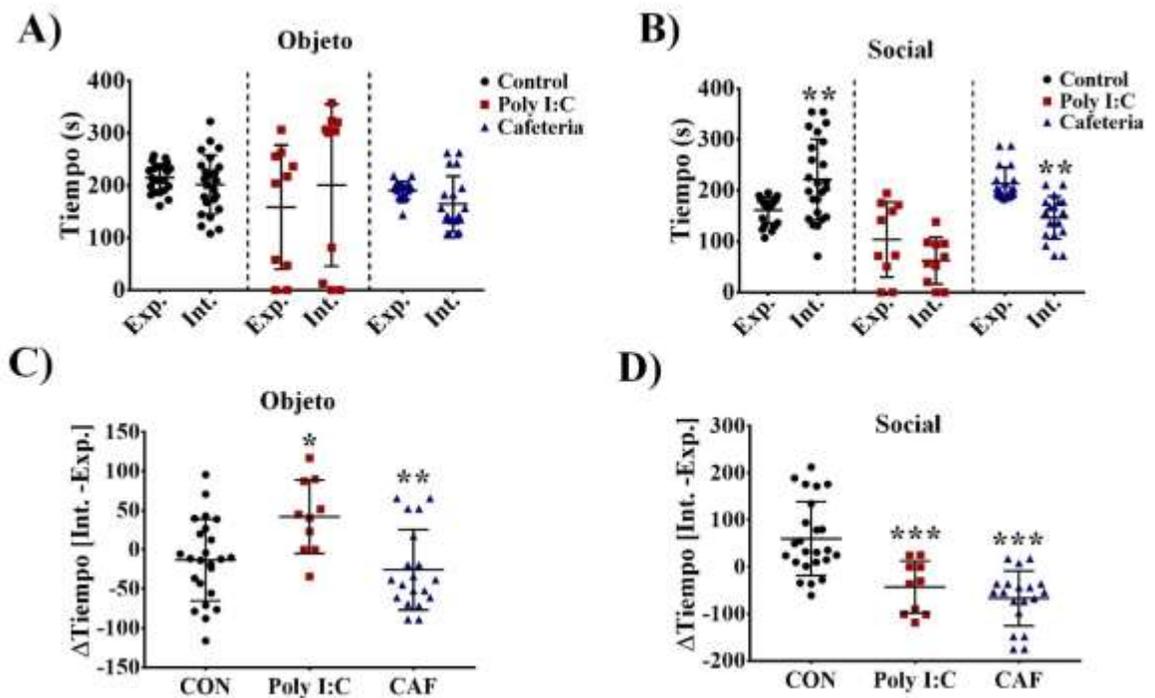
1 desconocido al compararse con el grupo control (Figura 11D). De este modo, identificamos
 2 que la programación fetal con los estímulos de Poly I:C y cafetería inducen en su
 3 descendencia un menor grado de socialización que la descendencia del grupo control, un
 4 trastorno conductual presente en el trastorno del espectro autista.
 5



6 **Figura 11. Resultados de la prueba de sociabilidad en machos.** A) Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del objeto inanimado cuando estaba vacía VS cuando se colocó el objeto (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005). B) Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del sujeto sociable cuando estaba vacía VS cuando se colocó al sujeto sociable (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005). C) Gráfica del grado de interacción con el objeto inanimado de los 3 grupos experimentales (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005). D) Gráfica del grado de interacción con el sujeto sociable de los 3 grupos experimentales (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005).

7
 8

1 La caracterización de conducta de sociabilidad de las hembras del grupo control
2 muestran un incremento en el tiempo de interacción con el sujeto desconocido, sin mostrar
3 cambios en el tiempo de interacción con el objeto inanimado (Figura 12 A y B). Por otra
4 parte, la descendencia de hembras del grupo Poly I:C no presentó cambios en el tiempo de
5 interacción con el sujeto desconocido, ni con el objeto inanimado. Para el caso de la
6 descendencia del grupo CAF muestra reducción en el tiempo de interacción con el sujeto
7 desconocido, sin mostrar cambios en la interacción con el objeto (Figura 12 A y B).
8 Analizando el grado de interacción con el sujeto desconocido se identificó que, de forma
9 similar a la observada con la descendencia de machos, las hembras programadas con Poly
10 I:C y dieta CAF exhiben un menor grado de interacción social que el grupo control (Figura
11 12 D). Sin embargo, a diferencia del grupo CAF, solo el grupo de hembras Poly I:C presentan
12 un mayor grado de interacción con el objeto inanimado, al ser comparado con el control
13 (Figura 12 C). De este modo podemos concluir que similar al grupo de los machos, las
14 hembras provenientes de la programación con agentes proinflamatorias durante el embarazo
15 y lactancia, presentan una reducción en su grado de sociabilidad, una característica clave en
16 el trastorno del espectro autista [153].



1

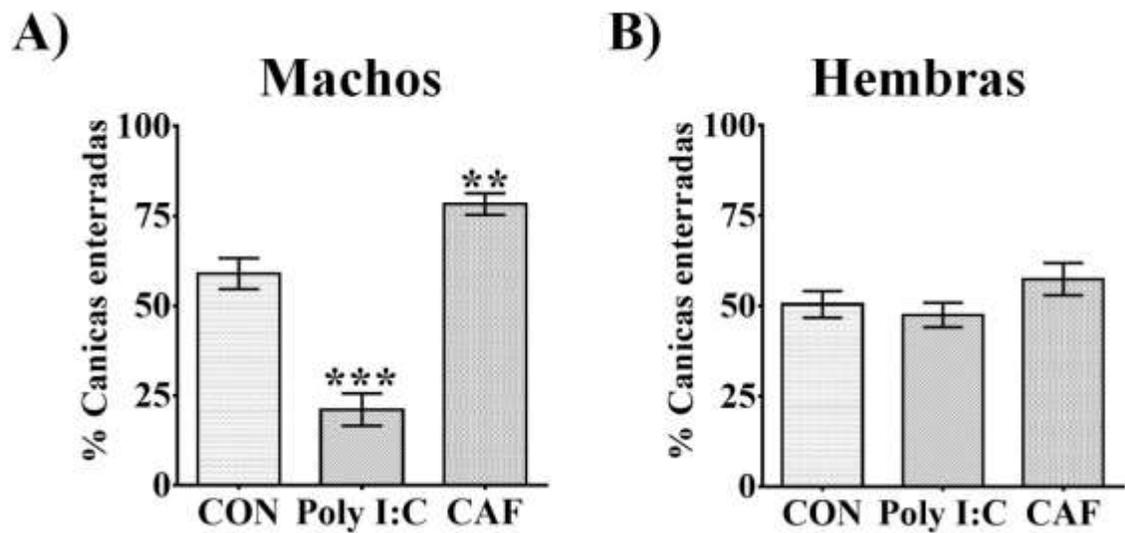
Figura 12. Resultados de la prueba de sociabilidad en hembras. **A)** Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del objeto inanimado cuando estaba vacía VS cuando se colocó el objeto (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF, prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE). **B)** Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del sujeto sociable cuando estaba vacía VS cuando se colocó al sujeto sociable (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01). **C)** Gráfica del grado de interacción con el objeto inanimado de los 3 grupos experimentales (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05, **p<0.01). **D)** Gráfica del grado de interacción con el sujeto sociable de los 3 grupos experimentales (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005).

2

3 Posterior a la caracterización de la conducta sociable, realizamos la prueba del
 4 entierro de canicas con la finalidad de identificar conducta estereotipada. En esta prueba se
 5 espera que los roedores entierren un porcentaje de canicas superior al 70%, que se interpreta
 6 como la presencia de conducta estereotipada [13], o bien, que los sujetos muestren un
 7 porcentaje de enterramiento de canicas de menos del 40%, también denota un trastorno
 8 asociado con el autismo [154]. En este contexto, inicialmente determinamos que un rango
 9 “normal” de canicas enterradas se encuentra entre el 40% y el 70%. Los resultados indican

1 que la descendencia de machos del grupo administrado con Poly I:C mostró un porcentaje de
2 canicas enterradas menor al 40% al compararse con el control, el cual enterró un promedio
3 del 55% de canicas (Figura 13A). Por su parte, el grupo CAF enterró el 77% de las canicas,
4 lo cual representa un porcentaje mayor que el mostrado por el grupo control (Figura 15A).

5 En la descendencia de hembras no se identificaron diferencias significativas en el
6 porcentaje de canicas enterradas comparando la descendencia del grupo Poly I:C y la
7 descendencia de dieta CAF al compararse contra el control (Figura 13B). Estos datos nos
8 indican un claro dimorfismo sexual en una conducta estereotipada en los grupos programados
9 con Poly I:C y dieta de cafetería, demostrando que las hembras son más resistentes a
10 presentar este rasgo conductual presente en el autismo.

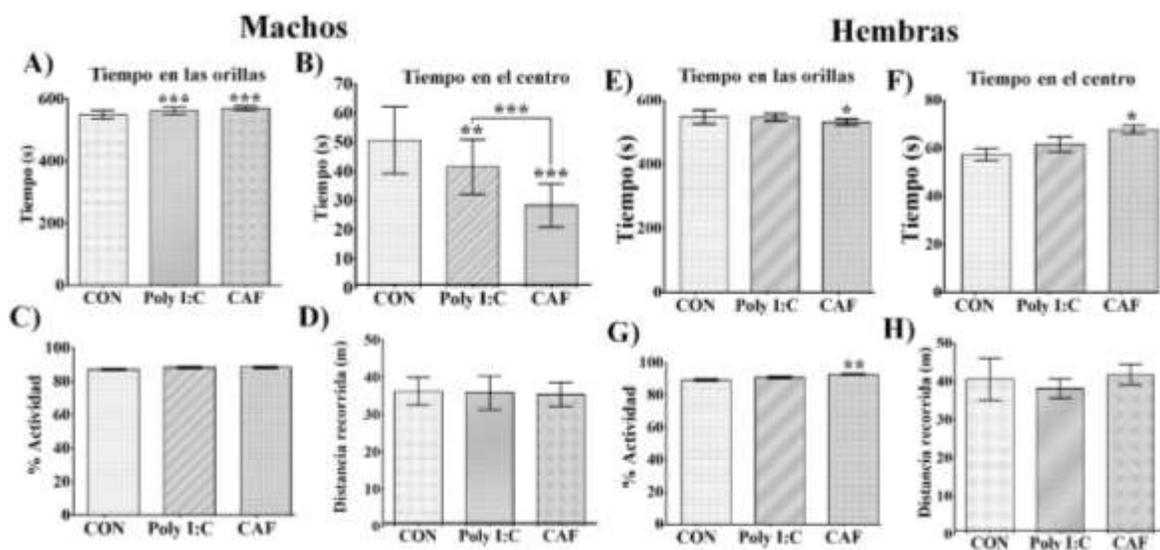


11 **Figura 13. Prueba de entierro de canicas.** A) Porcentaje de canicas enterradas por los grupos de programación control (55%), Poly I:C (20%), CAF (80%) en machos (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01, ***p<0.005). B) Porcentaje de canicas enterradas por los grupos de programación control (50%), Poly I:C (48%), CAF (55%) en hembras (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE).

12
13
14

1 Finalmente, se empleó la prueba de campo abierto para identificar alteraciones en la
2 movilidad. La descendencia de los grupos Poly I:C y CAF presentan mayor tiempo de
3 ubicación (20 segundos) en las orillas (Figura 14A) y menor tiempo (20 segundos) en el
4 centro de la arena (Figura 14B), al compararse con el control, sin cambios en el porcentaje
5 de actividad (Figura 14C) y en la distancia total recorrida (Figura 14D). De esta manera
6 confirmamos la presencia de un fenotipo similar a la ansiedad en nuestros modelos de
7 programación.

8 El análisis del campo abierto en la descendencia de las hembras muestra que el grupo
9 CAF presentó un incremento en el tiempo que paso en las orillas (10 segundos) (Figura 14E)
10 y una reducción en el tiempo que paso en el centro (15 segundos) (Figura 14F) al compararse
11 con su respectivo control. Por su parte, la descendencia del grupo Poly I:C no exhibió
12 cambios en el porcentaje de actividad (Figura 14 E, F, G), y en la distancia total recorrida
13 (Figura 14H). Nuevamente, estos datos corroboran el dimorfismo sexual presente en las
14 conductas aberrantes presentes en el TEA.



1

Figura 14. Prueba de campo abierto. **A)** Tiempo en segundos que pasaron los machos de los grupos CON, Poly I:C y CAF en las orillas de la arena (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005). **B)** Tiempo en segundos que pasaron los machos de los grupos CON, Poly I:C y CAF en el centro de la arena (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01, ***p<0.005). **C)** Porcentaje de actividad presentado por los machos de los grupos CON, Poly I:C y CAF durante los 10 min de la prueba (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE). **D)** Distancia total recorrida en metros por los machos de los grupos CON, Poly I:C y CAF durante los 10 min de la prueba (n= 24 CON, 25 Poly I:C, 25 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE). **E)** Tiempo en segundos que pasaron las hembras de los grupos CON, Poly I:C y CAF en las orillas de la arena (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05). **F)** Tiempo en segundos que pasaron las hembras de los grupos CON, Poly I:C y CAF en el centro de la arena (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05). **G)** Porcentaje de actividad presentado por las hembras de los grupos CON, Poly I:C y CAF durante los 10 min de la prueba (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01). **H)** Distancia total recorrida en metros por las hembras de los grupos CON, Poly I:C y CAF durante los 10 min de la prueba (n= 24 CON, 11 Poly I:C, 26 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE).

2

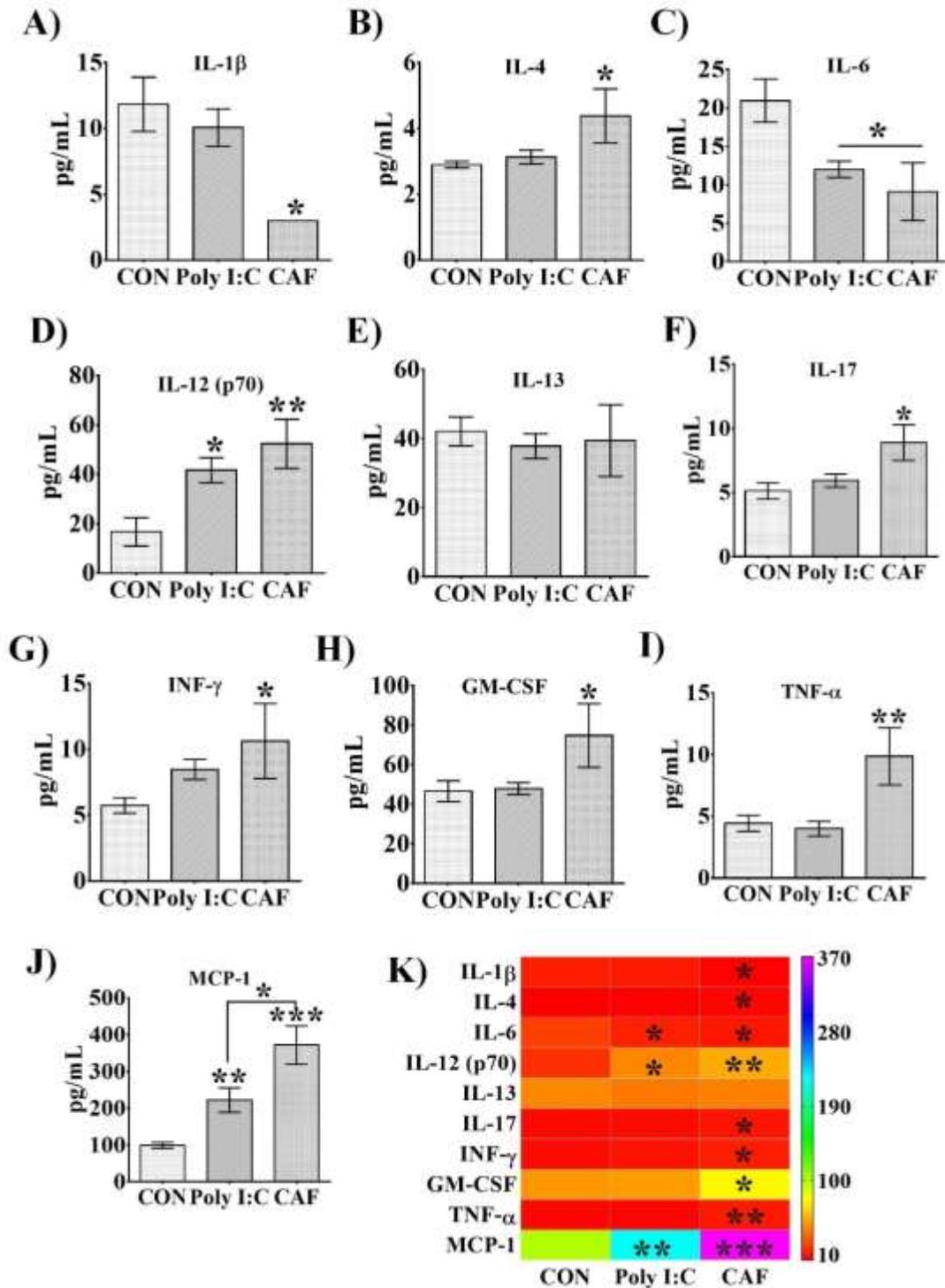
3

4

5

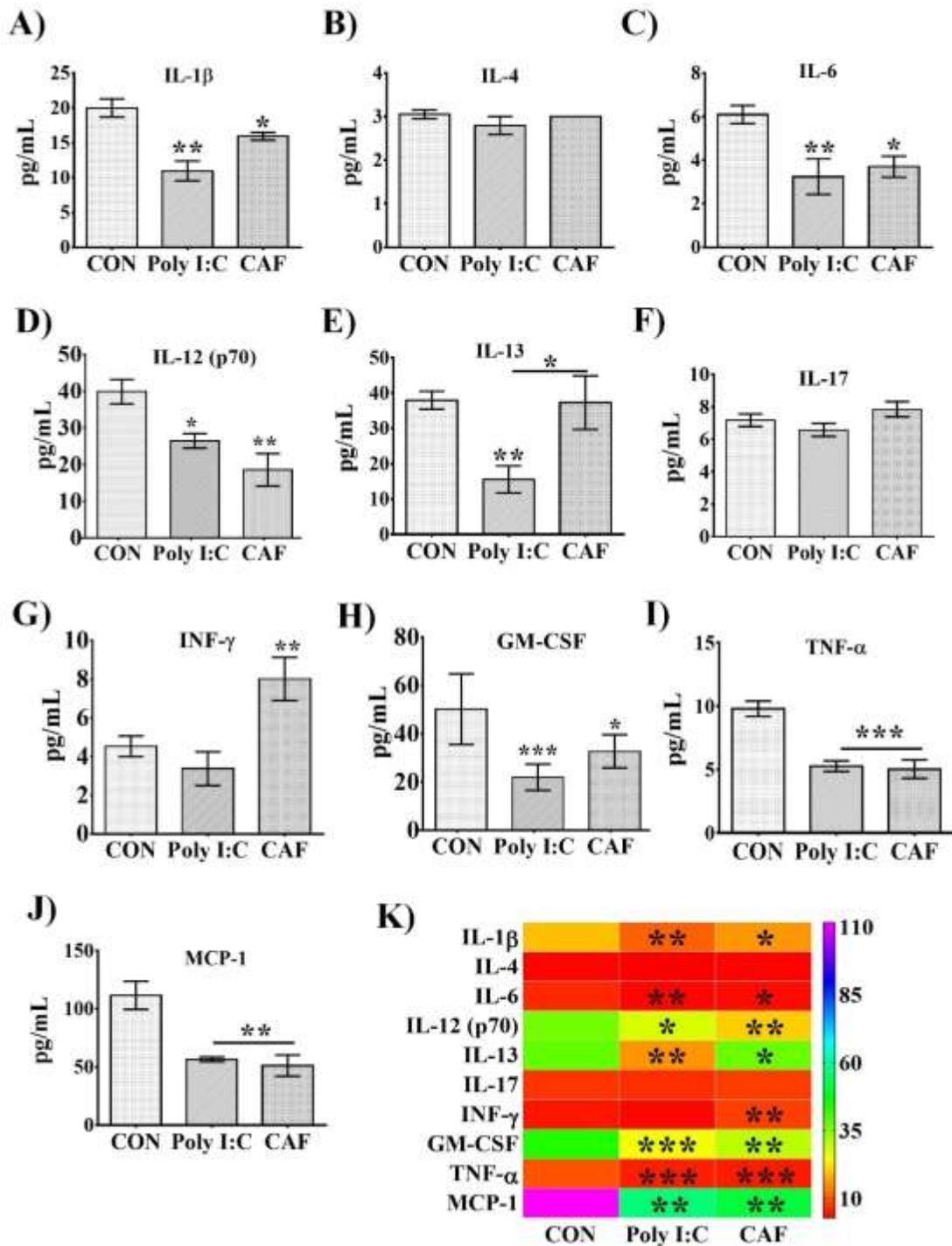
1 **La programación nutricional por dieta de cafetería promueve inflamación periférica**
2 **sin cambios en el perfil de citocinas en la corteza somatosensorial primaria (SSP)**

3 Posterior a la caracterización de los trastornos conductuales asociados con el TEA
4 en la descendencia de machos de madres expuestas a Poly I:C y a dieta CAF, procedimos a
5 identificar si la exposición a un ambiente proinflamatorio durante la gestación y lactancia es
6 suficiente para favorecer la acumulación de citocinas proinflamatorias en plasma. Nuestros
7 resultados indican que la descendencia de los machos del grupo CAF exhibieron una
8 reducción del 75% en la concentración periférica de IL-1 β (Figura 15A) e IL-6 (Figura 15C),
9 mientras que IL-4 (Figura 15B), IL-12(p70) (Figura 15D), IL-17, INF- γ , GM-CSF y TNF- α
10 (Figura 15F-I) incrementan sus niveles de expresión en comparación al control. De interés,
11 la MCP-1 (Figura 15J) mostró 4 veces mayor expresión a la observada en el control. Por su
12 parte, la descendencia del grupo de machos programados con Poly I:C solo presento
13 incremento en la expresión de IL-12(p70) (Figura 15D) y MCP-1(Figura 15J). De las
14 citocinas analizadas en machos, TNF- α y MCP-1 fueron las que mostraron los cambios más
15 significativos en el grupo CAF (Figura 15K). En las hembras pudimos observar el efecto
16 contrario, los grupos CAF y Poly I:C exhibieron una reducción en la concentración sérica de
17 IL-1 β (Figura 16A) e IL-6 (Figura 16C), IL-12(p70) (Figura 16D), GM-CSF (Figura 16H),
18 TNF- α and MCP-1 (Figura 16I y J), con disminución en la concentración de IL-13 (Figura
19 16E) e INF- γ (Figura 16G), sin cambios en IL-4 (Figura 16B) e IL-17 (Figura 16F). De forma
20 interesante, las citocinas que presentaron una mayor reducción en la descendencia de los
21 grupos Poly I:C y dieta CAF, fueron TNF- α y MCP-1 (Figura 16K).



1

Figura 15. Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en el plasma de los machos pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF. A) IL-1 β . B) IL-4. C) IL-6. D) IL-12(p70). E) IL-13. F) IL-17. G) INF- γ . H) GM-CSF. I) TNF- α . J) MCP-1. K) Mapa de calor del perfil de expresión de citocinas inflamatorias en el plasma de machos. (n= 12 CON, 16 Poly I:C, 10 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05, **p<0.01, *p<0.005).**

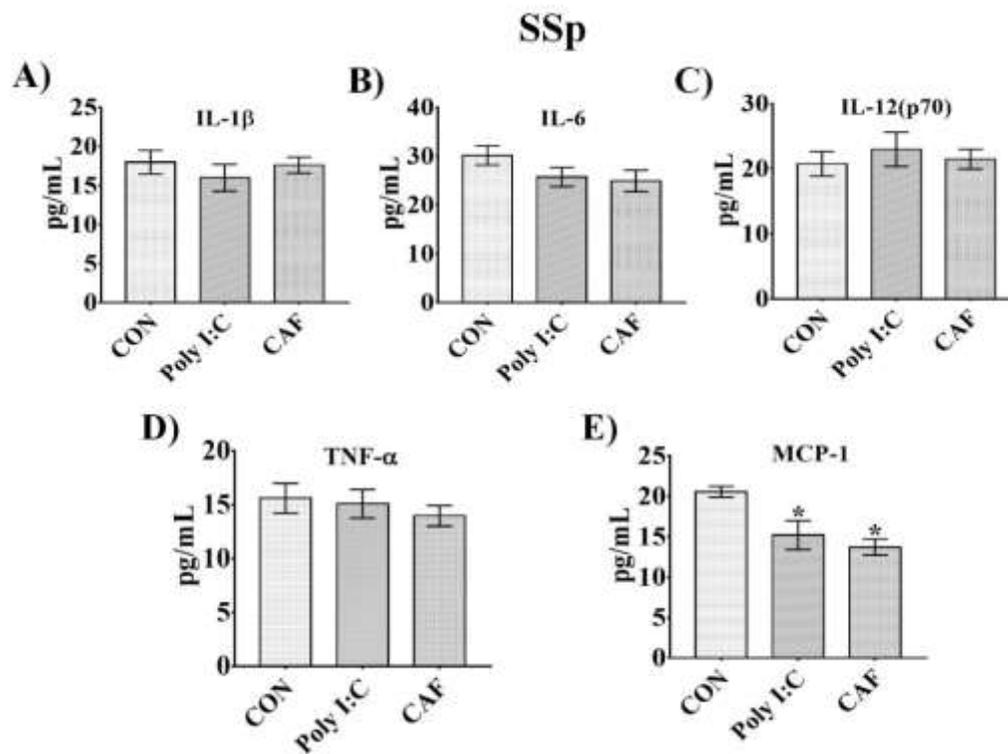


1

Figura 16. Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en el plasma de las hembras pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF. A) IL-1 β . B) IL-4. C) IL-6. D) IL-12(p70). E) IL-13. F) IL-17. G) INF- γ . H) GM-CSF. I) TNF- α . J) MCP-1. K) Mapa de calor del perfil de expresión de citocinas inflamatorias en el plasma de hembras. (n= 13 CON, 9 Poly I:C, 9 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05, **p<0.01, *p<0.005).**

2

1 De acuerdo con la literatura, el modelo de conducta similar al autismo inducido por
2 activación inmune materna (MIA) por Poly I:C propicia una reducción en el número de
3 neuronas presentes en la corteza somatosensorial acompañado por asociabilidad, conducta
4 estereotipada y ansiedad [4, 13]. Por esta razón, nos preguntamos si nuestro modelo de
5 programación por exposición a dieta CAF podría incrementar la expresión de las citocinas
6 proinflamatorias a nivel de la corteza somatosensorial, similar a las que identificamos en la
7 periferia. Inesperadamente, no encontramos cambios en el perfil de expresión de IL-1 β , IL-
8 6, IL-12(p70) y TNF- α (Figura 17A-D) en la región SSP, pero si observamos una
9 disminución estadísticamente significativa (26%) en los niveles de MCP-1 en el grupo Poly
10 I:C y del 33% en el grupo CAF (Figura 17E). Se conoce que las citocinas periféricas son
11 capaces de activar cruzar la barrera hematoencefálica y activar poblaciones neuronales
12 selectivas dentro del SNC [102, 106]. Con base en esta información, determinamos si la
13 modulación de los niveles de MCP-1, quién representa la quimiocina más altamente
14 acumulada en el plasma de la descendencia de los sujetos programados con dieta CAF, puede
15 modificar la conducta sociable.



1

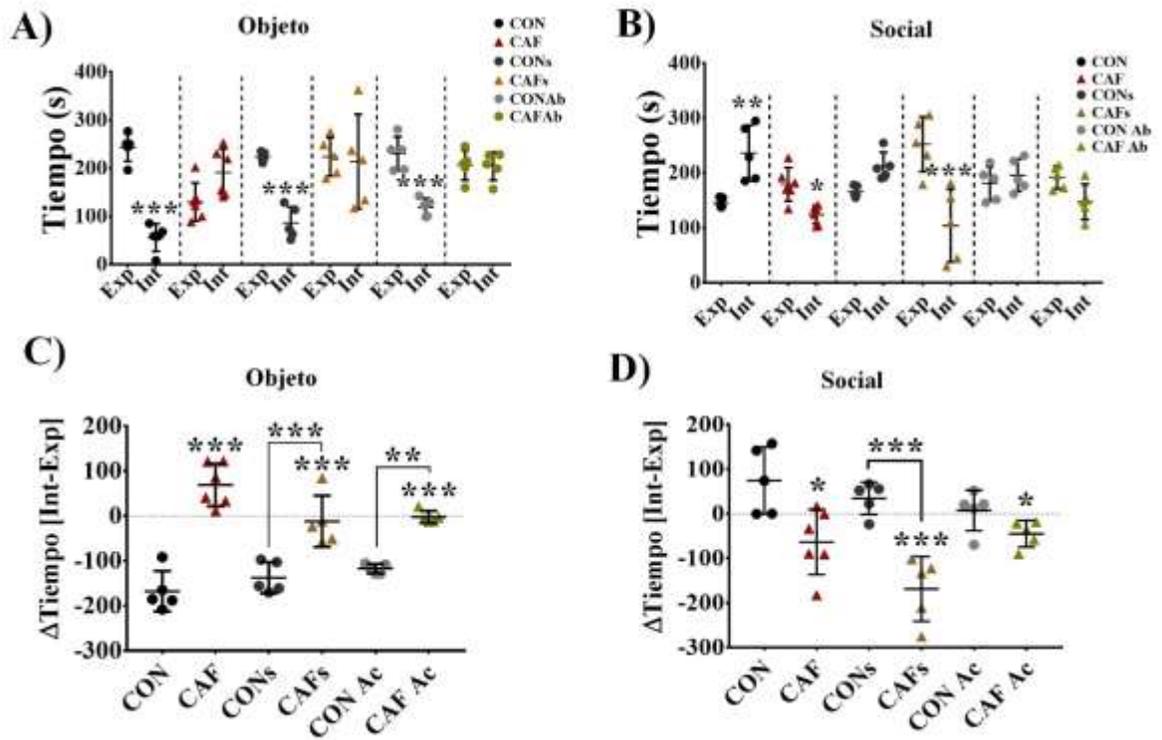
Figura 17. Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en la corteza somatosensorial primaria (SSp) de los machos pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF. A) IL-1 β . B) IL-6. C) IL-12(p70). D) TNF- α . E) MCP-1. (n= 10 CON, 9 Poly I:C, 8 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05).

2

3 **La administración de un anticuerpo neutralizante contra MCP-1 promueve cambios**
 4 **en el volumen de SSP y CbX y reestablece el grado de sociabilidad en la descendencia**
 5 **del grupo CAF**

6 Para confirmar el efecto de la neutralización de la vía MCP-1, realizamos la inyección
 7 intraperitoneal de un anticuerpo neutralizante contra MCP-1 a ratones macho que muestran
 8 conducta no sociable. Siguiendo el esquema de administración descrito en la Figura 9,
 9 identificamos que la administración con solución salina (CONs) a la descendencia de machos
 10 expuestos a dieta CAF no reduce la interacción con el objeto inanimado (Figura 18A), y
 11 tampoco incrementa el tiempo de interacción con el ratón desconocido (Figura 18B), en

1 comparación con los sujetos del grupo control (CON). De manera notable, la administración
2 de anticuerpo neutralizante contra MCP-1 (CONAc, 1.6µg/5 días) a la descendencia no
3 sociable de grupo CAF reduce la interacción con el objeto, y mejora parcialmente el tiempo
4 de interacción con el sujeto desconocido (Figura 18A-B). Si bien, al analizar el grado de
5 interacción social los grupos CAF, CAFs y CAFAc presentaron hasta tres veces más
6 interacción con el objeto inanimado en comparación a sus respectivos controles (Figura 18C),
7 solo los grupos CAF y CAFs muestran un grado de socialización de una y dos veces menor,
8 respectivamente, que sus controles (Figura 18D). Por su parte, la descendencia del grupo
9 CAF administrada con anticuerpo neutralizante contra MCP-1 no presentó diferencia
10 significativa contra el grupo CONAc, aunque exhibe una reducción significativa al
11 compararse contra el grupo CON (Figura 18D) y una tendencia ($p=0.056$) al aumento del
12 grado de interacción social al compararse con los grupos CAF y CAFs (Figura 18C y D).
13 Estos datos confirman que la administración de anticuerpo neutralizante contra el MCP-1
14 muestra mejoría parcial en el grado de sociabilidad de los roedores programados por dieta de
15 cafetería.



1

Figura 18. Resultados de la prueba de sociabilidad de los grupos administrados con solución salina o 1.6 μg de anticuerpo contra MCP-1 por 5 días. **A)** Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del objeto inanimado cuando estaba vacía VS cuando se colocó el objeto ($n=5$ en todos los grupos, prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; $***p<0.005$). **B)** Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del sujeto sociable cuando estaba vacía VS cuando se colocó al sujeto sociable ($n=5$ en todos los grupos; prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$). **C)** Gráfica del grado de interacción con el objeto inanimado de los 6 grupos experimentales ($n=5$ en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; $**p<0.01$, $***p<0.005$). **D)** Gráfica del grado de interacción con el sujeto sociable de los 6 grupos experimentales ($n=5$ en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; $*p<0.05$, $***p<0.005$).

2

3

4

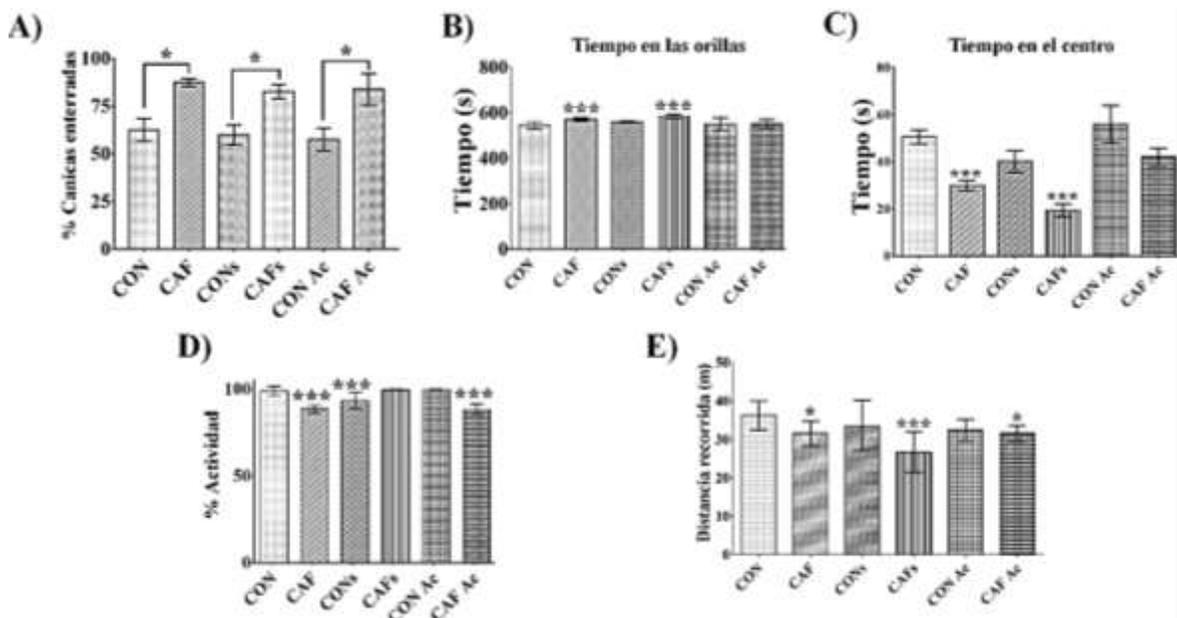
5

6

1 Durante el desempeño de los modelos en la prueba de entierro de canicas se identificó
2 que los grupos CAF, CAFs y CAFAc enterraron un 87%, 82% y 83% de las canicas,
3 respectivamente, dando una diferencia estadísticamente significativa en comparación a sus
4 respectivos controles (Figura 19A). Estos datos indican que la administración de 1.6 μ /g5 días
5 de Ac contra MCP-1 no tiene efecto en la conducta repetitiva/estereotipada de nuestro
6 modelo de TEA. En el caso de la prueba de campo abierto, los grupos CAF y CAFs
7 presentaron mayor tiempo en las orillas de la arena (40 segundos) en comparación con el
8 grupo control. Además, el grupo CAFAc no mostró diferencia significativa en el tiempo en
9 las orillas en comparación a los controles (Figura 19B). Los grupos CAF y CAFs presentaron
10 una reducción estadísticamente significativa en el tiempo en el centro de la arena al
11 compararse con los controles; sin cambios en el grupo CAFAc (Figura 19C). Finalmente, los
12 grupos CAF, CAFs y CAFAc muestran menor porcentaje de actividad (Figura 19D) y de
13 distancia total recorrida (Figura 19E) a la obtenida por los grupos control. Estos resultados
14 proponen que la administración del anticuerpo neutralizante contra MCP-1 revirtió de forma
15 parcial la interacción con el objeto inanimado y el fenotipo de ansiedad observado en los
16 ratones programados con dieta CAF.

17

18



1

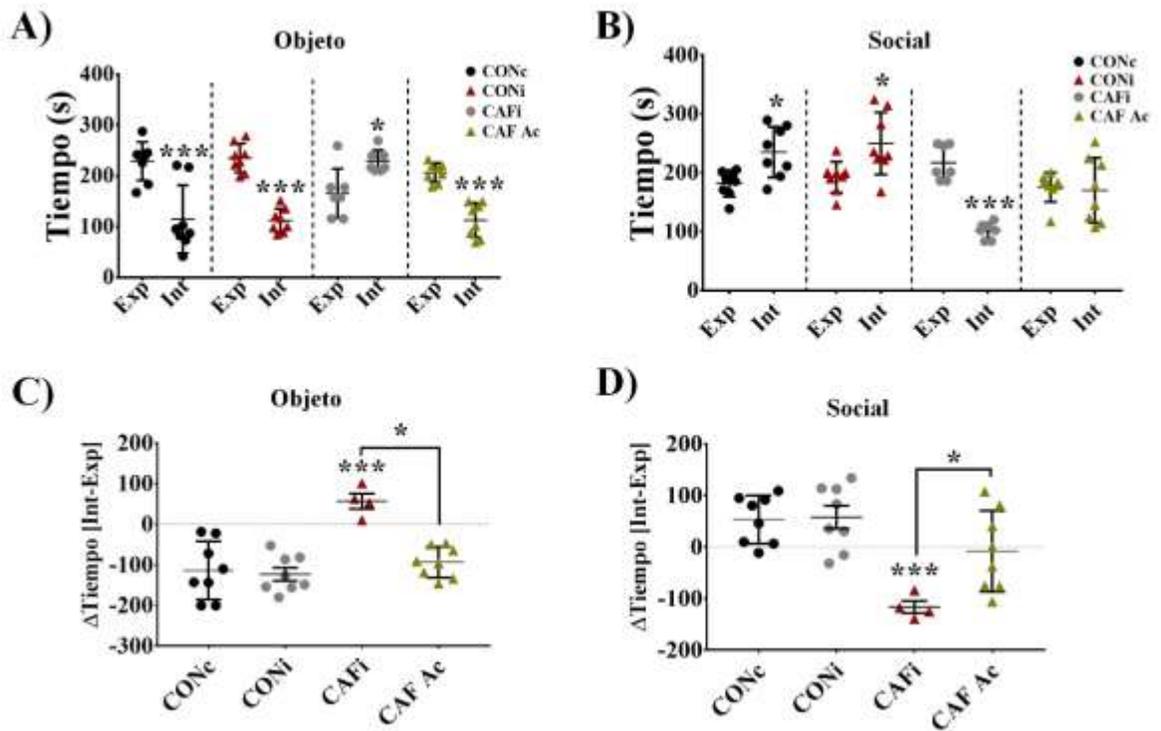
Figura 19. Prueba de entierro de canicas y campo abierto de los grupos administrados con solución salina o 1.6 μ g de anticuerpo contra MCP-1 por 5 días. **A)** Porcentaje de canicas enterradas por los grupos de programación CON (55%), CAF (85%), CONs (55%), CAFs (80%), CON Ac (50%), CAF Ac (80%) (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; * p <0.05). **B)** Tiempo en segundos que pasaron los machos, administrados con solución salina o anticuerpo neutralizante, en las orillas de la arena (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *** p <0.005). **C)** Tiempo en segundos que pasaron los machos, administrados con solución salina o anticuerpo neutralizante, en las orillas el centro del a arena (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *** p <0.005). **D)** Porcentaje de actividad presentado por los machos administrados con solución salina o anticuerpo neutralizante durante los 10 min de la prueba (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *** p <0.005). **E)** Distancia total recorrida en metros por los machos administrados con solución salina o anticuerpo neutralizante durante los 10 min de la prueba (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; * p <0.05, *** p <0.005).

2

3

4 Con esta evidencia, decidimos realizar un segundo protocolo de administración de
 5 anticuerpo neutralizante contra MCP-1 incrementando la dosis de 1.6 μ g a 8 μ g, como se
 6 detalla en la Figura 9B-E. Los resultados indican que la administración i.p. de 8 μ g de
 7 anticuerpo neutralizante contra el MCP-1 decrece la interacción con el objeto inanimado

1 similar al grupo control y al administrado con el anticuerpo IgG isotipo (CAFAC vs CON, vs
2 CONi) (Figura 20A). Los grupos CON y CONi mostraron un incremento en la interacción
3 con el sujeto desconocido (Figura 20B). Por su parte, el grupo CAFi decrece eficientemente
4 su interacción con el objeto inanimado y aumenta la interacción con el sujeto desconocido a
5 valores similar al control (Figura 20B) (Figura 20C y D). Estos datos evidencian de forma
6 contundente que la administración de un anticuerpo neutralizante contra MCP-1 reestablece
7 la sociabilidad de individuos programados con dieta de cafetería.



1

Figura 20. Resultados de la prueba de sociabilidad de los grupos administrados con anticuerpo isotipo IgG o 8 µg de anticuerpo contra MCP-1 por 3 días. **A)** Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del objeto inanimado cuando estaba vacía VS cuando se colocó el objeto (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05, ***p<0.005). **B)** Gráfica de comparación del tiempo en segundos que pasaron los roedores en la cámara del sujeto sociable cuando estaba vacía VS cuando se colocó al sujeto sociable (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; prueba T de student, la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05). **C)** Grafica del grado de interacción con el objeto inanimado de los 4 grupos experimentales (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01, ***p<0.005). **D)** Gráfica del grado de interacción con el sujeto sociable de los 4 grupos experimentales (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01, ***p<0.005).

2

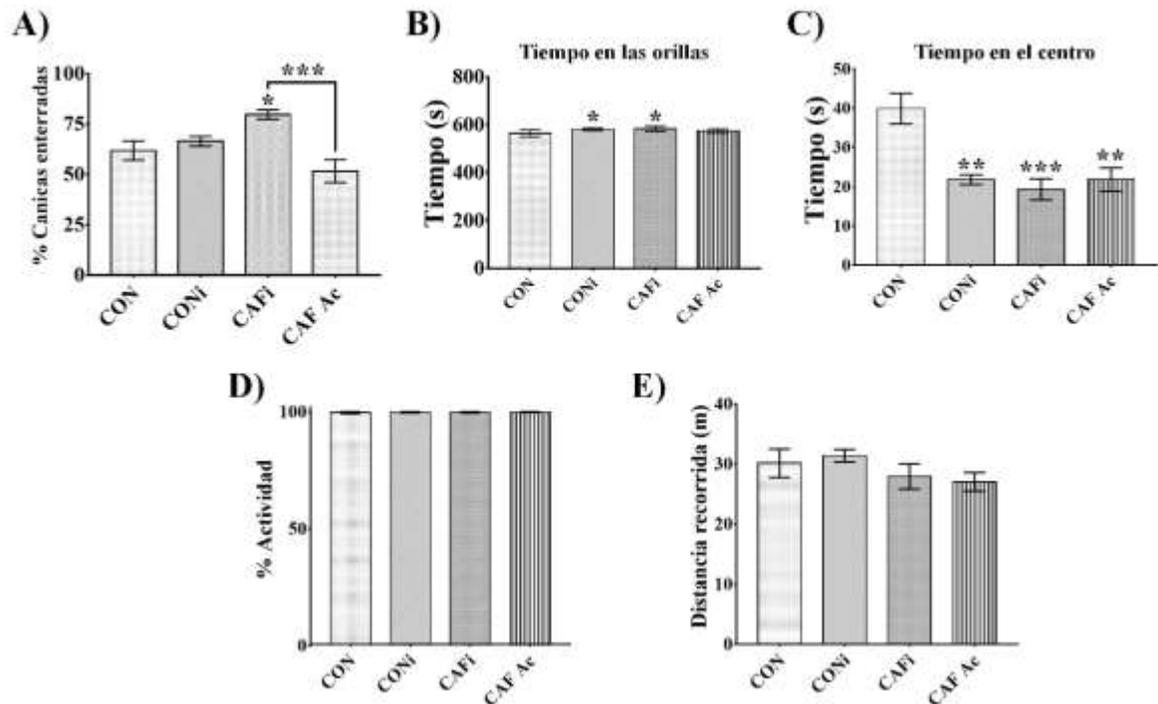
3

4

5

6

1 En la prueba de entierro de canicas obtuvimos resultados similares, el grupo CAFi
2 enterró un 77% de las canicas, siendo porcentaje significativamente mayor que los controles
3 que enterraron 55% (CON) y 60% (CONi) de las canicas y que el grupo CAFAc que enterró
4 un 47% de las canicas (Figura 21A). Por otra parte, en la prueba de campo abierto no se
5 identificaron diferencias significativas en el tiempo que pasan los sujetos en las orillas de la
6 arena posterior a la administración de anticuerpo contra MCP-1 (grupo CAFAc vs Control)
7 (Figura 21B), sin embargo, se observa reducción significativa en el tiempo que pasaron en el
8 centro de la arena los grupos CONi, CAFi y CAFAc comparados con el control (Figura 21C).
9 No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos
10 cuando se cuantifico el porcentaje de actividad (Figura 21D) y la distancia total recorrida
11 (Figura 21E). Estos resultados, nos motivan a concluir que la administración del anticuerpo
12 neutralizante contra MCP-1 mejora la conducta repetitiva/estereotípica en la descendencia
13 programada con dieta CAF y reestablece de manera parcial el fenotipo de ansiedad.



1

Figura 21. Prueba de entierro de canicas y campo abierto de los grupos administrados con solución salina o 8 μ g de anticuerpo contra MCP-1 por 3 días. **A)** Porcentaje de canicas enterradas por los grupos de programación CON (55%), CONi (60%), CAFi (77%), CAF Ac (47%) (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05, ***p<0.005). **B)** Tiempo en segundos que pasaron los machos, administrados con anticuerpo isotipo IgG o anticuerpo neutralizante, en las orillas de la arena (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05). **C)** Tiempo en segundos que pasaron los machos, administrados con anticuerpo isotipo IgG o anticuerpo neutralizante, en las orillas el centro del a arena (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p<0.01, ***p<0.005). **D)** Porcentaje de actividad presentado por los machos administrados con anticuerpo isotipo IgG o anticuerpo neutralizante durante los 10 min de la prueba (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE). **E)** Distancia total recorrida en metros por los machos administrados con anticuerpo isotipo IgG o anticuerpo neutralizante durante los 10 min de la prueba (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE).

2

3

4

5

1 En la siguiente serie de experimentos determinamos si la mejoría conductual de los
2 sujetos posterior a la administración periférica del anticuerpo contra MCP-1, se relaciona con
3 la modulación estructural del cerebro. Identificamos que la administración del anticuerpo
4 contra MCP-1 promovió cambios estructurales significativos en 9 regiones cerebrales que se
5 especifican en la Tabla 4. De las 9 regiones, la corteza somatosensorial primaria (SSP) y el
6 lóbulo 10 del cerebelo muestran el mayor incremento y decremento comparado con el
7 control, respectivamente (Figura 22A). La SSP muestra 50% de aumento de volumen en el
8 grupo CONAc al compararlo con CON, y alcanza un incremento del 200% al comparar
9 CAFAc contra el grupo CAF (Figura 22B). Por su parte, la región del lóbulo 10 del cerebelo
10 (CbX) decrece hasta 200% en el grupo CONAc y el CAFAc (Figura 22A y C). No existen
11 diferencias significativas al comparar CONs y CAFs (Figura 22C).

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

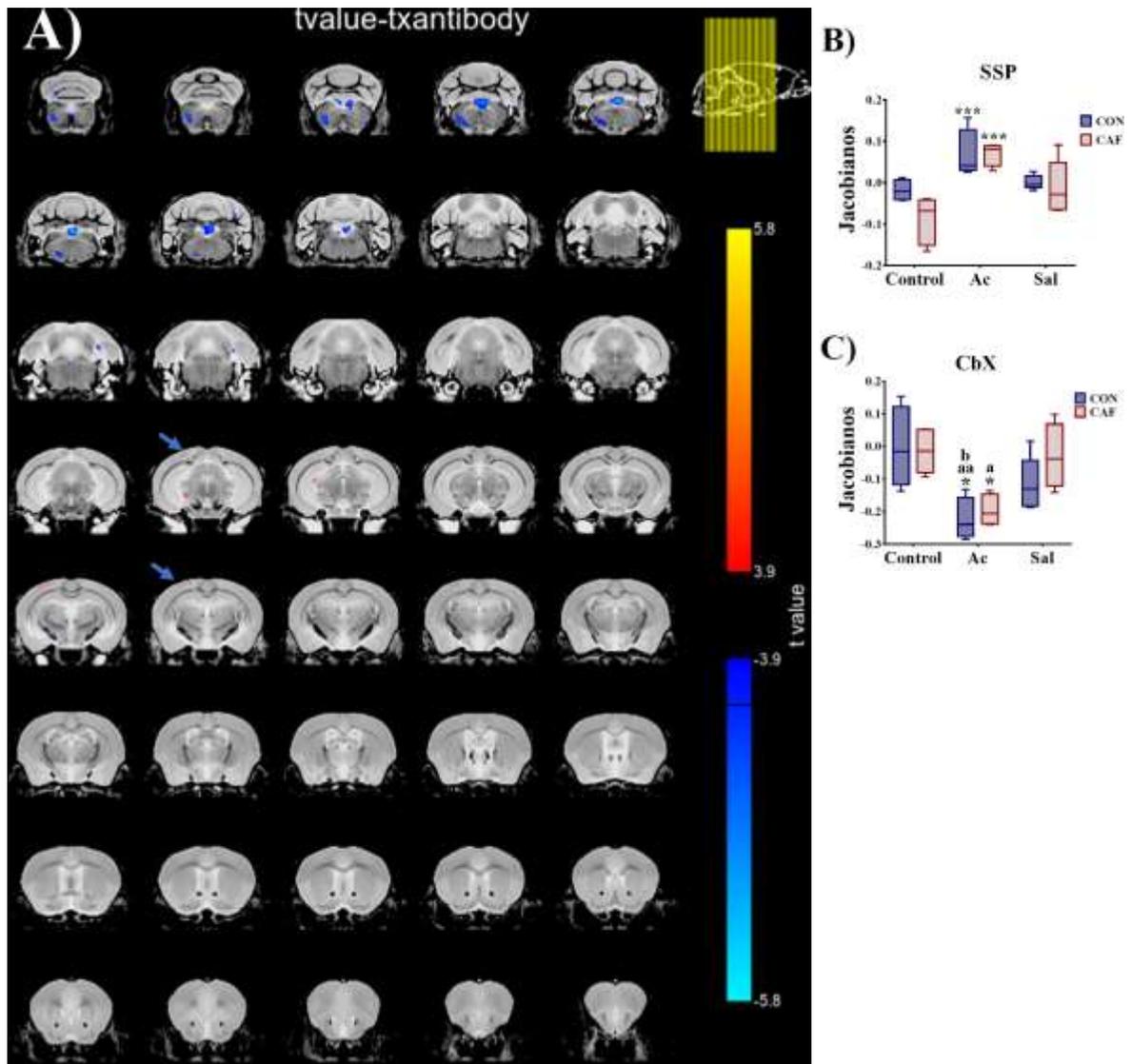


Figura 22. Gráficos del Análisis por Resonancia Magnética Nuclear Morfométrica en base a deformación del grupo administrado con 1.6 μ g de anticuerpo contra MCP-1 por 5 días. A) cambio de volumen de la corteza somatosensorial primaria (SSP) y lóbulo 10 del cerebelo (CbX) al comparar los grupos administrados con anticuerpo contra los no administrados; el color rojo indica incremento de volumen y el color azul indica disminución. B) Gráfica de jacobianos donde se compara el cambio de volumen en SSP de los grupos control y cafetería administrados con solución salina o anticuerpo contra los grupos sin tratamiento (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; ***p<0.005). C) Gráfica de jacobianos donde se compara el cambio de volumen en CbX de los grupos control y cafetería administrados con solución salina o anticuerpo contra los grupos sin tratamiento. (n= 5 en todos los grupos; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; *p<0.05, ^ap<0.05 VS CON-CAF, ^{aa}p<0.01 VS CON-CAF, ^bp<0.01 VS Sal-CAF).

Tabla 4. Regiones que presentaron cambio de volumen en los grupos CON y CAF administrados con anticuerpo neutralizante de MCP-1 por 5 días

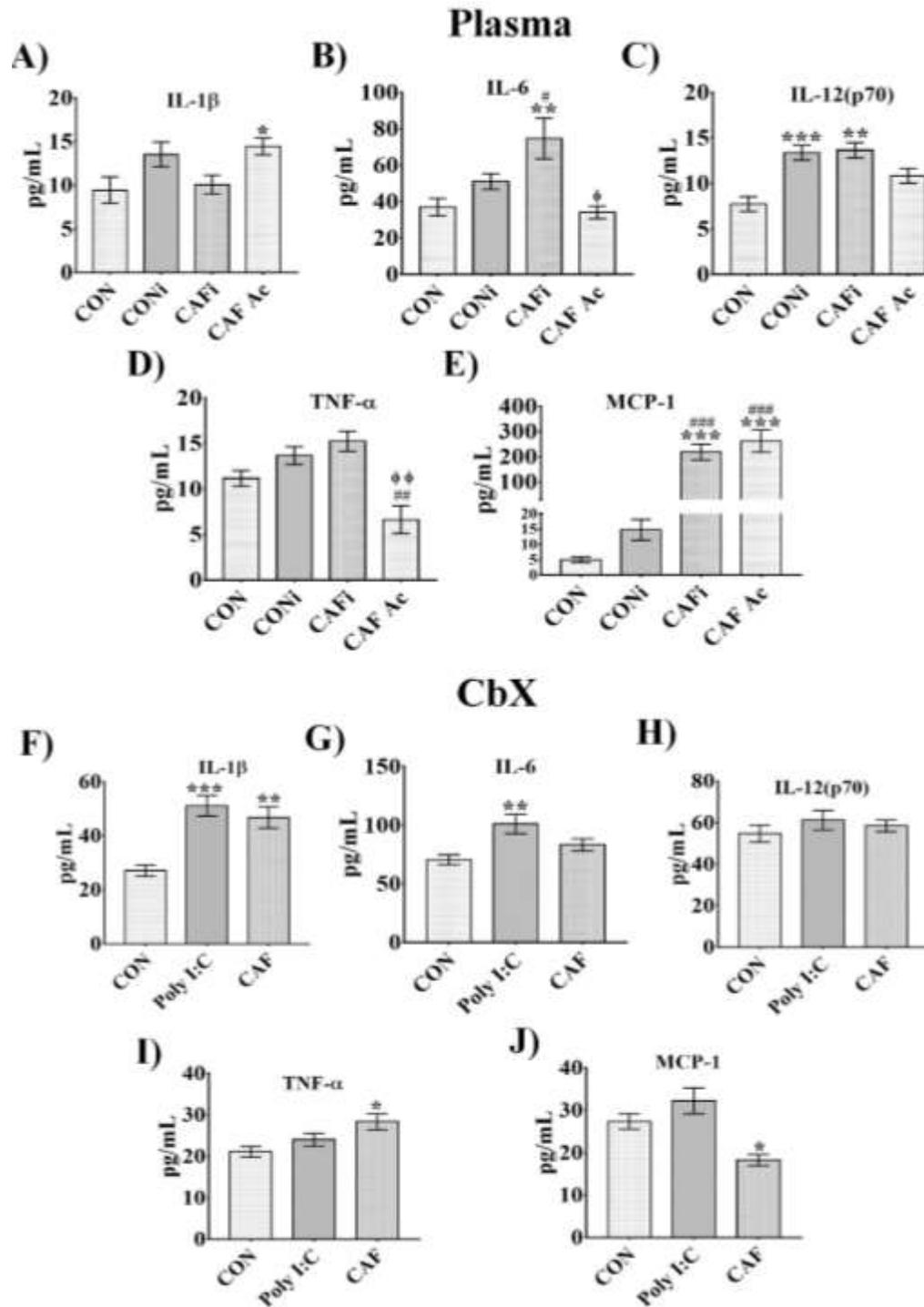
Región	Hemisferio	Cambio de volumen	Valor de t
<i>Corteza somatosensorial primaria</i>	<i>Derecho</i>	<i>Aumento</i>	5.538
Mesencéfalo	Derecho	Aumento	4.667
Lóbulo 6 del cerebelo	Derecho	Aumento	4.416
<i>Lóbulo 10 del cerebelo</i>	<i>Izquierdo</i>	<i>Disminución</i>	-5.795
Lóbulo 8 del cerebelo	Derecho	Disminución	-5.058
Pedúnculo cerebral	Derecho	Disminución	-4.466
Pedúnculo cerebral	Izquierdo	Disminución	-4.422
Medula	Izquierdo	Disminución	-4.356
Medula	Derecho	Disminución	-4.137
Flóculo	Izquierdo	Disminución	-4.058

1

2

3 En la siguiente serie de experimentos determinamos si la mejoría conductual de los
4 sujetos posterior a la administración periférica del anticuerpo contra MCP-1, se relaciona con
5 la modulación sistémica y central del perfil proinflamatorio. Con base en los resultados de
6 resonancia magnética, nos enfocamos en el perfil de citocinas del CbX. Los resultados
7 indican que la administración periférica del anticuerpo contra MCP-1 no modifica la
8 concentración de IL-1 β (Figura 23A), IL-12(p70) (Figura 23C) y MCP-1 (Figura 23E) en los
9 grupos CAFi y CAFAc al ser comparados con los controles. De interés, el bloqueo de la vía
10 MCP-1 reduce los niveles de IL-6 (Figura 23B) y TNF- α en comparación al grupo control
11 (Figura 23D). Además, los resultados indican que el CbX de los sujetos expuesto a dieta CAF
12 presentan incremento de 2.5 veces en la concentración de IL-1 β (Figura 23F), incremento del
13 50% en TNF- α (Figura 23I) y reducción del 25% en los niveles de MCP-1 (Figura 23J) en el
14 grupo CAF, sin cambios en IL-17, IL-6 (Figura 23H).

15



1

Figura 23. Perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en el plasma de roedores administrados con 8µg/3 días de anticuerpo neutralizante y perfil de citocinas en CbX de los machos pertenecientes a los grupos CON, Poly I:C y CAF. **A)** IL-1β. **B)** IL-6. **C)** IL-12(p70). **D)** TNF-α. **E)** MCP-1. (n= 8 CONc, 8 CONi, 4 CAFi, 8 CAF Ac; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media ± EE; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005). **F)** IL-1β. **G)** IL-6. **H)** IL-12(p70). **I)** TNF-α. **J)** MCP-1. (n= 10 CON, 9 Poly I:C, 8 CAF; ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media ± EE; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005).

1 Finalmente, decidimos comprobar si el incremento de volumen macroestructural,
2 observado en la SSP del modelo administrado con el anticuerpo neutralizante contra MCP-
3 1, está acompañado por modificaciones microestructurales en la morfología de las células de
4 la microglía. Como se puede observar en la Figura 24, los grupos de roedores programados
5 con dieta CAF presentan una reducción generalizada en el número de células Iba1+ (Figura
6 24A-E), conteo de ramificaciones y terminaciones dendríticas (Figura 24F-G), al ser
7 comparados con el grupo control administrado con el anticuerpo isotipo. Es importante
8 recalcar, que el grupo CAF administrado con el anticuerpo contra MCP-1 presentó una
9 reducción estadísticamente significativa en el número de terminaciones celulares al ser
10 comparado con el grupo CAF administrado con el anticuerpo isotipo (Figura 24G).

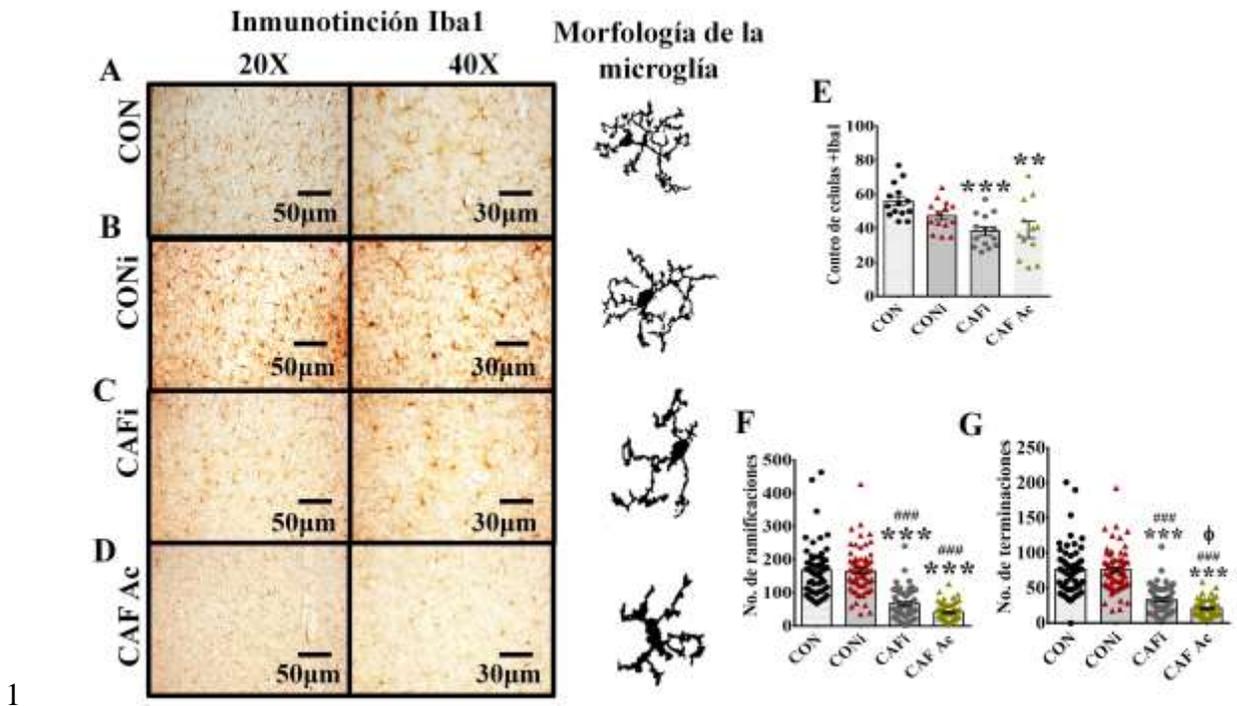


Figura 24. La inoculación sistémica de 8µg/3 días de anticuerpo neutralizante modifica la morfología de las células de la microglía en SSP. Fotografías representativas de inmunotinciones contra Iba1 en SSP en roedores **A)** control (CON). **B)** controles administrados con anticuerpo isotipo (CONi). **C)** programados con dieta CAF y administrados con anticuerpo isotipo (CAFi). **D)** programados con dieta CAF y administrados con anticuerpo neutralizante contra MCP-1 (CAF Ac). **E)** conteo de células Iba1 positivas (microglía). **F)** número de ramificaciones dendríticas en las células Iba1 positivas. **G)** número de terminaciones dendríticas en las células Iba1 positivas. (n= 5 por grupo. ANOVA dos vías; la gráfica muestra datos normalizados de la media \pm EE; **p< 0.01, ***p< 0.005 comparado contra CON; ###p< 0.005 comparado contra CONi; ϕ p < 0.05 comparado contra CAFi).

2
3
4
5
6
7
8
9

VIII. DISCUSIÓN

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

En este trabajo experimental mostramos vías neuroinmunológicas dependientes del sexo aparentemente involucradas en el comportamiento social en la descendencia de ratones. Identificamos que la exposición materna a una dieta rica en carbohidratos y grasa de origen animal (CAF), que simula un alto valor energético, promueve un comportamiento similar al autismo en la descendencia masculina, que involucran defectos en la interacción social, comportamiento estereotipado y un fenotipo ansiolítico. Además, confirmamos que la exposición a la dieta CAF promueve un aumento notorio en los niveles plasmáticos de MCP-1 en la descendencia masculina que exhibe fenotipo similar al autismo. Particularmente, el bloqueo sistémico de la señalización de MCP-1 por un anticuerpo neutralizante favoreció cambios en el volumen macroscópico de SSP y CbX, y en la morfología de la microglía y, el restablecimiento de la interacción social en la descendencia. Estos datos destacan a la vía de MCP-1 como un nuevo blanco inmunogénico de alimentos con un alto valor energético, los cuales son capaces de producir alteraciones volumétricas cerebrales y morfológicas de la microglía propiciando deficiencias en el comportamiento social de la descendencia masculina.

El empleo de ratones para caracterizar conductas psiquiátricas ha sido un modelo eficaz para reproducir algunos de los rasgos clínicos presentes en el humano. Nuestro modelo de programación fetal por exposición a dieta de cafetería reproduce defectos de interacción social (Figura 10), conducta estereotípica que induce un mayor porcentaje de canicas enterradas (Figura 14A) y un fenotipo ansioso (Figura 13A-D), conductas clave en el diagnóstico del autismo [4, 13, 113]. Por su parte, la administración de Poly I:C mostró reducción en su interacción social y un fenotipo ansioso, mientras que el porcentaje de canicas enterradas fue significativamente menor al control, un efecto totalmente contrario a

1 lo reportado en diversos artículos [4, 13, 113]. Este hecho pudiera ser ocasionado por algún
2 tipo de disfunción motriz [155], sin embargo los resultados de porcentaje de actividad y
3 distancia recorrida invalidan esta idea. Algunos otros autores reportan que el bajo porcentaje
4 de canicas enterradas puede deberse a una respuesta de ansiedad ante un ambiente novedoso
5 [154]. Concebimos que ésta pudiera ser la explicación más probable en nuestro modelo,
6 considerando que los modelos presentan un fenotipo de ansiedad de acuerdo con la prueba
7 de campo abierto.

8 Confirmando los resultados identificados en la descendencia de machos, la
9 descendencia de hembras del grupo de cafetería mostró baja sociabilidad (Figura 11), sin
10 cambios en el porcentaje de canicas enterradas (Figura 12B) y ni en el fenotipo parecido a la
11 ansiedad (Figura 13E-H). Por su parte, las hembras del grupo Poly I:C, presentaron baja
12 sociabilidad (Figura 13), sin cambios en el porcentaje de canicas enterradas (Figura 12B) ni
13 en la ansiedad (Figura 13E-H). Estos datos indican que la severidad de la conducta
14 estereotipada y la ansiedad en las hembras de los grupos programados es menor a la
15 observada en los machos. Estos datos confirman lo que se observa en la población humana,
16 evidenciando que los varones poseen un riesgo casi 5 veces mayor a presentar TEA [103].
17 Por este motivo podemos concluir que la exposición materna a una dieta rica en grasas y
18 azúcares durante el periodo pregestacional, gestacional y lactancia es un factor de riesgo para
19 el desarrollo de conductas aberrantes críticas en el TEA en la población masculina de nuestro
20 modelo murino.

21 La exposición materna a una dieta rica en grasas y azúcares también induce
22 incremento en el perfil de citocinas que incluyen a la IL-17, IL-1 β , TNF- α y MCP-1 en la
23 descendencia macho (Fig. 16), las cuales han sido reportadas en modelos murinos, primates
24 no-humanos y humanos con ASD [4, 13, 156]. Las hembras mostraron un perfil totalmente
25 contrario al de los machos, en donde se observó disminución en la concentración de IL-1 β ,

1 GM-CSF, TNF- α y MCP-1 [105, 157]. Estos perfiles de citocinas podrían estar asociadas
2 con la baja severidad del fenotipo de ansiedad y conducta estereotipada [158]. Entre las
3 citocinas que analizamos, la MCP-1 fue la que mostró el mayor incremento en concentración,
4 llegando a superar por 4 veces la concentración del control. Sabiendo esto y que su
5 incremento en plasma se ha asociado con el desarrollo de TEA en humanos y modelos
6 animales [110, 111, 159]. De forma interesante, un estudio realizado en 2020, demostró que
7 MCP-1 regula la sociabilidad en la descendencia de un modelo de programación fetal por
8 estrés [159]. Si bien, al identificar el perfil de citocinas en SSP, encontramos una disminución
9 de MCP-1 (Figura 16), es posible que se exhiban efectos selectivos dependiendo de la región
10 del SNC [157] y la edad del individuo [153]. Además, las citocinas pueden activar una
11 respuesta neuronal a través de los receptores de TNF- α e IL-1 β presentes en células del
12 endotelio cerebral y nervio vago [102] y con ello modular la conducta de sociabilidad.

13 Uno de los aportes más importantes de este proyecto es la confirmación de que la
14 administración de un anticuerpo neutralizante contra MCP-1 reestablece la conducta sociable
15 en los modelos murinos. De interés, nuestros resultados indican que el efecto del anticuerpo
16 neutralizante contra MCP-1 es dependiente de su concentración. A la dosis de 1.6 μ g mejora
17 parcialmente la conducta sociable, mientras que a la dosis de 8 μ g reestablece la conducta
18 sociable, sin cambios en los parámetros de ansiedad y entierro de canicas. El mejoramiento
19 de la conducta sociable correlaciona con incremento de volumen de la SPP y disminución de
20 volumen en CbX, ambas regiones previamente involucradas en el ASD [13, 160]. De interés,
21 estos cambios fueron observables solo en los grupos administrados con el anticuerpo,
22 independientemente de la dieta lo que sugiere que el anticuerpo modula el volumen cerebral
23 de regiones selectivas. En este contexto podemos proponer que MCP-1 participa de forma
24 más estrecha en la sociabilidad de los individuos.

1 Una de las principales hipótesis de nuestro proyecto fue demostrar que la
2 neuroinflamación o acumulación de citocinas proinflamatorias se observa en regiones
3 cerebrales involucradas en la conducta sociable. El análisis de la concentración de citocinas
4 en el CbX de la descendencia de madres expuestas a Poly I:C o dieta CAF exhibe decremento
5 de MCP-1 (Figura 21J), e incremento de IL-1 β y TNF- α (Figura. 21 F e I). Estos resultados
6 parecen contradictorios puesto que MCP-1 regula de forma positiva la expresión de los genes
7 de TNF- α e IL-1 β en el CNS [161–163] y estos, a su vez, ejercen una retroalimentación
8 positiva promoviendo la producción de MCP-1 [164, 165]. Sin embargo, el efecto modulador
9 de la señal ejercida por el MPC-1 podría no activarse en el cerebro, ya que es conocido que
10 interleucinas producidas a nivel central, como IL-1 β , inducen la expresión de TNF- α , IL-1 β
11 y MCP-1 en el hígado a través de vesículas extracelulares [166], las cuales pueden exacerbar
12 la inflamación en otras regiones críticas en el TEA mediante la interacción con el nervio vago
13 o promover inflamación directamente en los órganos circunventriculares [102]. Esta
14 hipótesis es apoyada por la reducción observada de TNF- α en el plasma de los roedores
15 administrados con el anticuerpo neutralizante (Figura 21D) y que su concentración en plasma
16 esta positivamente correlacionada con la severidad del TEA en humanos [167, 168].
17 Finalmente, identificamos que la señalización de MCP-1 también regula la plasticidad
18 morfológica de la microglía en la descendencia diagnosticada con una conducta similar al
19 TEA. Análisis morfológicos de la microglía presente en la SSP de la descendencia macho
20 programada con dieta CAF mostró un fenotipo activado, un cuerpo celular agrandado, y
21 reducción en el número, grosor y longitud de las ramificaciones. Reportes indican que la
22 sobreexpresión de MCP-1 en ratones promueve un aumento de la reactividad hacia Iba-1
23 [169]. Además, se sabe que la microglía sufre un proceso de polarización hacia un estado
24 reactivo en respuesta a infección o lesiones [170]. Además, modelos murinos de
25 encefalomiелitis autoinmune experimental [171] y en ratones con bigotes recortados

1 unilateralmente [172] han reportado activación de la microglía en la región cortical SSP, lo
2 que sugiere que la plasticidad morfológica de la microglía responde a estímulos sensoriales
3 externos. De acuerdo con análisis previos de la dimensión fractal de la morfología de la
4 microglía, la microglía activa de nuestro estudio parece imitar una etapa previa al fenotipo
5 reactivo que presenta características inflamatorias y fagocíticas [173].

6 Actualmente, es aceptado que un estímulo neuroinflamatorio promueve cuatro
7 parámetros morfológicos en la microglía activa, que incluyen dimensión fractal, lacunaridad
8 y densidad, en regiones selectivas del cerebro. El efecto de la inoculación del anticuerpo
9 neutralizante de MCP-1 en la morfología de la microglía, en nuestro estudio, evidencia que
10 estímulos prenatales modula la transición morfológica hacia un fenotipo activo en SPP,
11 resultando en la mejoría del comportamiento social y disminución de la ansiedad en ratones.
12 Un estudio reciente confirma nuestra propuesta mostrando que el estrés prenatal promueve
13 déficits en la sociabilidad y comportamiento similar a la ansiedad en la descendencia de
14 ratones carentes del receptor de MCP-1 [112]. De ser cierto, el bloqueo de la función MCP-
15 1 en el cerebro podría modular positivamente las vías cerebrales mejorando los
16 comportamientos relacionados con el autismo en la descendencia mucho expuesta a la dieta
17 CAF.

18 Una de las limitantes más importantes de este estudio, radica en no logra establecer
19 con precisión una asociación molecular de la acumulación de MCP-1 en plasma que favorece
20 los cambios volumétricos en la SSP y el CbX. Es necesario realizar una investigación más
21 extensiva para determinar un blanco molecular de MCP-1, que sea capaz de integrar los
22 cambios volumétricos y morfológicos observados en el cerebro y microglía, respectivamente,
23 con los defectos en la conducta social de la descendencia. Desafortunadamente para este
24 proyecto, todos los análisis de escáner por resonancia magnética nuclear deben realizarse *ex*
25 *vivo*, por lo que nos es imposible determinar con precisión una causalidad entre los cambios

1 volumétricos en SSP y CbX y las variables inmunológicas y conductuales como si lo sería
2 en un estudio longitudinal. Por lo que se recomienda realizar un estudio a distintas etapas del
3 desarrollo en este mismo modelo.

4

5

IX. CONCLUSIONES

6

7 El presente estudio confirma que la exposición a una dieta con alto valor calórico
8 durante la programación fetal promueve el desarrollo de trastornos conductuales asociados
9 al autismo en la descendencia macho y, en menor grado, en la descendencia hembra.
10 Identificamos que la exposición de dietas altas en grasa y azúcar favorece un claro perfil
11 proinflamatorio sistémico en la descendencia, en donde la quimiocina MCP-1 es la especie
12 de mayor relevancia. Notablemente, la modulación de los niveles de MCP-1 mejora el
13 comportamiento social en la descendencia macho expuesta a dieta CAF durante la
14 programación fetal asociado a cambios en la morfología de la microglía y cambios
15 volumétricos en la SSP y el CbX.

16 El presente trabajo destaca la relevancia de las redes inmunogénicas asociadas a
17 cambios volumétricos del cerebro durante períodos críticos de desarrollo embrionario.

18

19

20

21

22

X. PERSPECTIVAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

- a. Modular la expresión de TNF- α en SSP y CbX para observar si existen cambios en la conducta social de los roedores.
- b. Buscar moléculas que inhiban la vía MCP-1/TNF- α para su empleo como tratamiento de TEA.
- c. Explorar el papel de MCP-1 y TNF- α en etapas tempranas del neurodesarrollo (embarazo y lactancia) para proponer este mecanismo como un blanco para tratamiento preventivo del TEA.

XI. REFERENCIAS

- 1
2
3 1. Maenner MJ, Shaw KA, Bakian A V., Bilder DA, Durkin MS, Esler A, et al.
4 Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged
5 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites,
6 United States, 2018. *MMWR Surveill Summ.* 2021;70:1–16.
- 7 2. Fombonne E, Marcin C, Manero AC, Bruno R, Diaz C, Villalobos M, et al.
8 Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey.
9 *J Autism Dev Disord.* 2016;46:1669–1685.
- 10 3. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet
11 MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism.
12 *JAMA J Am Med Assoc.* 2011;306:2001–2010.
- 13 4. Shin Yim Y, Park A, Berrios J, Lafourcade M, Pascual LM, Soares N, et al.
14 Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation.
15 *Nature.* 2017:1–24.
- 16 5. Wegiel J, Flory M, Kuchna I, Nowicki K, Ma SY, Imaki H, et al. Stereological study
17 of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed
18 with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and
19 cerebellum. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:141.
- 20 6. Scott JA, Schumann CM, Goodlin-Jones BL, Amaral DG. A comprehensive
21 volumetric analysis of the cerebellum in children and adolescents with autism
22 spectrum disorder. *Autism Res.* 2009;2:246–257.
- 23 7. Shakiba A. The role of the cerebellum in neurobiology of psychiatric disorders.
24 *Neurol Clin.* 2014;32:1105–1115.
- 25 8. Pinchefskey EF, Accogli A, Shevell MI, Saint-Martin C, Srour M. Developmental
26 outcomes in children with congenital cerebellar malformations. *Dev Med Child*
27 *Neurol.* 2019. 2019. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14059>.
- 28 9. Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li X, et al. Elevated immune
29 response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol.* 2009;207:111–116.

- 1 10. Buehler MR. A proposed mechanism for autism: An aberrant neuroimmune response
2 manifested as a psychiatric disorder. *Med Hypotheses*. 2011;76:863–870.
- 3 11. Ravaccia D, Ghafourian T. Critical Role of the Maternal Immune System in the
4 Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. *Biomedicines*. 2020;8:557.
- 5 12. Mahic M, Mjaaland S, Bøvelstad HM, Gunnes N, Susser E, Bresnahan M, et al.
6 Maternal Immunoreactivity to Herpes Simplex Virus 2 and Risk of Autism Spectrum
7 Disorder in Male Offspring. *MSphere*. 2017;2:e00016-17.
- 8 13. Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, et al. Maternal gut bacteria
9 promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*. 2017. 2017.
10 <https://doi.org/10.1038/nature23910>.
- 11 14. Arrode-Brusés G, Brusés JL. Maternal immune activation by poly(I:C) induces
12 expression of cytokines IL-1 β and IL-13, chemokine MCP-1 and colony stimulating
13 factor VEGF in fetal mouse brain. *J Neuroinflammation*. 2012;9:605.
- 14 15. Arsenault D, St-Amour I, Cisbani G, Rousseau LS, Cicchetti F. The different effects
15 of LPS and poly I: C prenatal immune challenges on the behavior, development and
16 inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain Behav Immun*.
17 2014;38:77–90.
- 18 16. Getz KD, Anderka MT, Werler MM, Jick SS. Maternal Pre-pregnancy Body Mass
19 Index and Autism Spectrum Disorder among Offspring: A Population-Based Case–
20 Control Study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2016;30:479–487.
- 21 17. Andersen CH, Thomsen PH, Nohr EA, Lemcke S. Maternal body mass index before
22 pregnancy as a risk factor for ADHD and autism in children. *Eur Child Adolesc*
23 *Psychiatry*. 2017. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00787-017-1027-6>.
- 24 18. Maldonado-Ruiz R, Cárdenas-Tueme M, Montalvo-Martínez L, Vidaltamayo R,
25 Garza-Ocañas L, Reséndez-Perez D, et al. Priming of hypothalamic ghrelin signaling
26 and microglia activation exacerbate feeding in rats' offspring following maternal
27 overnutrition. *Nutrients*. 2019;11.
- 28 19. Maldonado-Ruiz R, Montalvo-Martínez L, Fuentes-Mera L, Camacho A. Microglia

- 1 activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes.
2 *Nutr Diabetes*. 2017;7:e254.
- 3 20. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental
4 Disorders, Fourth Edition, Text Revision. vol. Washington. 2000.
- 5 21. Kern JK. The possible role of the cerebellum in autism/PDD: Disruption of a
6 multisensory feedback loop. *Med Hypotheses*. 2002;59:255–260.
- 7 22. Mercadante MT, Cysneiros RM, Schwartzman JS, Arida RM, Cavalheiro EA,
8 Scorza FA. Neurogenesis in the amygdala: A new etiologic hypothesis of autism?
9 *Med Hypotheses*. 2008;70:352–357.
- 10 23. Murcia CL, Gulden F, Herrup K. A question of balance: A proposal for new mouse
11 models of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23:265–275.
- 12 24. Christensen DL, Baio J, Braun KVN, Bilder D, Charles J, Constantino JN, et al.
13 Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged
14 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites,
15 United States, 2012. *MMWR Surveill Summ*. 2016;65:1–23.
- 16 25. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, et
17 al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol*.
18 2017;134:537–566.
- 19 26. Penner M, Anagnostou E, Andoni LY, Ungar WJ. Systematic review of clinical
20 guidance documents for autism spectrum disorder diagnostic assessment in select
21 regions. *Autism*. 2018;22:517–527.
- 22 27. Teffer K, Semendeferi K. Human prefrontal cortex. Evolution, development, and
23 pathology. vol. 195. 1st ed. Elsevier B.V.; 2012.
- 24 28. Courchesne E, Karns CM, Davis HR, Ziccardi R, Carper RA, Tigue ZD, et al.
25 Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI
26 study. *Neurology*. 2001;57:245–254.
- 27 29. Courchesne E, Campbell K, Solso S. Brain growth across the life span in autism:
28 Age-specific changes in anatomical pathology. *Brain Res*. 2011;1380:138–145.

- 1 30. Levitt JG, Blanton RE, Smalley S, Thompson PM, Guthrie D, McCracken JT, et al.
2 Cortical sulcal maps in autism. *Cereb Cortex*. 2003;13:728–735.
- 3 31. Herbert MR, Ziegler DA, Makris N, Filipek PA, Kemper TL, Normandin JJ, et al.
4 Localization of White Matter Volume Increase in Autism and Developmental
5 Language Disorder. *Ann Neurol*. 2004;55:530–540.
- 6 32. Sosa-Díaz N, Bringas ME, Atzori M, Flores G. Prefrontal cortex, hippocampus, and
7 basolateral amygdala plasticity in a rat model of autism spectrum. *Synapse*.
8 2014;68:468–473.
- 9 33. Codagnone MG, Podestá MF, Uccelli NA, Reinés A. Differential Local Connectivity
10 and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus
11 in the Valproic Acid Rat Model of Autism. *Dev Neurosci*. 2015;37:215–231.
- 12 34. Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in
13 the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala.
14 *Trends Neurosci*. 1997;20:517–523.
- 15 35. Loonen AJM, Ivanova SA. Circuits regulating pleasure and happiness: The evolution
16 of reward-seeking and misery-fleeing behavioral mechanisms in vertebrates. *Front*
17 *Neurosci*. 2015;9.
- 18 36. Tsvetkov EA, Krasnoshchekova EI, Vesselkin NP, Kharazova AD. Amygdala:
19 Neuroanatomy and Neurophysiology of Fear. *J Evol Biochem Ans Physiol*.
20 2015;51:406–418.
- 21 37. Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: The role of
22 the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*.
23 2002;26:321–352.
- 24 38. Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: From
25 animal models to human behavior. *Neuron*. 2005;48:175–187.
- 26 39. Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile
27 autism. *Neurology*. 1985;35:866–866.
- 28 40. Herrington JD, Maddox BB, Kerns CM, Rump K, Worley JA, Bush JC, et al.

- 1 Amygdala Volume Differences in Autism Spectrum Disorder Are Related to
2 Anxiety. *J Autism Dev Disord.* 2017;0:1–10.
- 3 41. Barnea-Goraly N, Frazier TW, Piacenza L, Minshew NJ, Keshavan MS, Reiss AL, et
4 al. A preliminary longitudinal volumetric MRI study of amygdala and hippocampal
5 volumes in autism. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2014;48:124–
6 128.
- 7 42. Olde Loohuis NFM, Kole K, Glennon JC, Karel P, Van der Borg G, Van Gemert Y,
8 et al. Elevated microRNA-181c and microRNA-30d levels in the enlarged amygdala
9 of the valproic acid rat model of autism. *Neurobiol Dis.* 2015;80:42–53.
- 10 43. Yildirim E, Zhang Z, Uz T, Chen CQ, Manev R, Manev H. Valproate administration
11 to mice increases histone acetylation and 5-lipoxygenase content in the
12 hippocampus. *Neurosci Lett.* 2003;345:141–143.
- 13 44. Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, et al.
14 Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71
15 Risk Loci. *Neuron.* 2015;87:1215–1233.
- 16 45. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, et
17 al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature.*
18 2014;515:209–215.
- 19 46. Shigemori T, Sakai A, Takumi T, Itoh Y, Suzuki H. Altered Microglia in the
20 Amygdala Are Involved in Anxiety-related Behaviors of a Copy Number Variation
21 Mouse Model of Autism. *J Nippon Med Sch.* 2015;82:92–99.
- 22 47. Breece E, Paciotti B, Nordahl CW, Ozonoff S, Van de Water JA, Rogers SJ, et al.
23 Myeloid dendritic cells frequencies are increased in children with autism spectrum
24 disorder and associated with amygdala volume and repetitive behaviors. *Brain Behav*
25 *Immun.* 2013;31:69–75.
- 26 48. Butler AB, Hodos W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and*
27 *Adaptation: Second Edition.* 2005.
- 28 49. Bae YK, Kani S, Shimizu T, Tanabe K, Nojima H, Kimura Y, et al. *Anatomy of*

- 1 zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Dev Biol.*
2 2009;330:406–426.
- 3 50. Meek J, Hafmans TGM, Maler L, Hawkes R. Distribution of zebrin II in the
4 gigantocerebellum of the mormyrid fish *Gnathonemus petersii* compared with other
5 teleosts. *J Comp Neurol.* 1992;316:17–31.
- 6 51. Hibi M, Shimizu T. Development of the Cerebellum and Cerebellar Neural Circuits.
7 2011:282–301.
- 8 52. Ito M. Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev*
9 *Neurosci.* 2008;9:304–313.
- 10 53. Dur E, Oca FM, Alvarez E, Jim F. Cognitive and emotional functions of the teleost
11 fish cerebellum. 2005;66:365–370.
- 12 54. Courchesne E, Yeung-Courchesne R, Hesselink JR, Jernigan TL. Hypoplasia of
13 Cerebellar Vermal Lobules VI and VII in Autism. *N Engl J Med.* 1988;318:1349–
14 1354.
- 15 55. Stanfield AC, McIntosh AM, Spencer MD, Philip R, Gaur S, Lawrie SM. Towards a
16 neuroanatomy of autism: A systematic review and meta-analysis of structural
17 magnetic resonance imaging studies. *Eur Psychiatry.* 2008;23:289–299.
- 18 56. Holttum JR, Minshew NJ, Sanders RS, Phillips NE. Magnetic resonance imaging of
19 the posterior fossa in autism. *Biol Psychiatry.* 1992;32:1091–1101.
- 20 57. Piven J, Nehme E, Simon J, Barta P, Pearlson G, Folstein SE. Magnetic resonance
21 imaging in autism: measurement of the cerebellum, pons, and fourth ventricle. *Biol*
22 *Psychiatry.* 1992;31:491–504.
- 23 58. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015;25:R1116–R1121.
- 24 59. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. *Cold*
25 *Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:1–18.
- 26 60. Bristot Silvestrin R, Bambini-Junior V, Galland F, Daniele Bobermim L, Quincozes-
27 Santos A, Torres Abib R, et al. Animal model of autism induced by prenatal

- 1 exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res.*
2 2013;1495:52–60.
- 3 61. Raymond G V., Bauman ML, Kemper TL. Hippocampus in autism: a Golgi analysis.
4 *Acta Neuropathol.* 1995;91:117–119.
- 5 62. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Vafae F, Moghadas M. Increased hippocampal
6 cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism.
7 *Brain Res.* 2013;1526:15–25.
- 8 63. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker
9 protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
10 1986;83:3500–3504.
- 11 64. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, et al. A
12 *Neurologin-3* Mutation Implicated in Autism Increases Inhibitory Synaptic
13 Transmission in Mice. *Science (80-)*. 2007;318:71–76.
- 14 65. Colvert E, Tick B, Mcewen F, Stewart C, Curran R, Woodhouse E, et al. Heritability
15 of Autism Spectrum Disorder in a UK Population- Based Twin Sample. *JAMA*
16 *Psychiatry.* 2015;72:415–423.
- 17 66. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, et al. Most genetic
18 risk for autism resides with common variation. *Nat Genet.* 2014;46:881–885.
- 19 67. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, et
20 al. Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23
21 *Williams Syndrome Region*, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron.*
22 2011;70:863–885.
- 23 68. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al. Strong
24 Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science (80-)*.
25 2007;316:445–449.
- 26 69. Sanders SJ. First glimpses of the neurobiology of autism spectrum disorder. *Curr*
27 *Opin Genet Dev.* 2015;33:80–92.
- 28 70. Anway MD, Tran DA, Li AX, Warden C, Bai AY, Singh P, et al. Epigenetic

- 1 Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* (80-
2). 2005;308:1466–1469.
- 3 71. Skinner MK. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational
4 inheritance. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2011;93:51–55.
- 5 72. Guerrero-Bosagna C, Savenkova M, Haque MM, Nilsson E, Skinner MK.
6 Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered
7 Sertoli Cell Transcriptome and Epigenome: Molecular Etiology of Male Infertility.
8 *PLoS One.* 2013;8.
- 9 73. Bohacek J, Mansuy IM. Molecular insights into transgenerational non-genetic
10 inheritance of acquired behaviours. *Nat Rev Genet.* 2015;16:641–652.
- 11 74. Prickett AR, Oakey RJ. A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals.
12 *Mol Genet Genomics.* 2012;287:621–630.
- 13 75. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat*
14 *Rev Genet.* 2007;8:253–262.
- 15 76. Kaminsky Z, Wang SC, Petronis A. Complex disease, gender and epigenetics. *Ann*
16 *Med.* 2006;38:530–544.
- 17 77. Kantor B, Shemer R, Razin A. The Prader-Willi/Angelman imprinted domain and its
18 control center. *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 113, 2006. p. 300–305.
- 19 78. Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum*
20 *Genet.* 2010;18:8–14.
- 21 79. Vassoler FM, Sadri-Vakili G. Mechanisms of transgenerational inheritance of
22 addictive-like behaviors. *Neuroscience.* 2014;264:198–206.
- 23 80. Gauthier TW, Drews-Botsch C, Falek A, Coles C, Brown LAS. - Maternal alcohol
24 abuse and neonatal infection.; - Alcoholism, clinical and experimental research. -
25 *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29:1035–1043.
- 26 81. Latino-Martel P, Chan DSM, Druesne-Pecollo N, Barrandon E, Hercberg S, Norat T.
27 Maternal alcohol consumption during pregnancy and risk of childhood leukemia:

- 1 systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*
2 2010;19:1238–1260.
- 3 82. Amir RE, Van den Veyver I. B, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett
4 syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-
5 binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23:185–188.
- 6 83. Uno Y, Uchiyama T, Kurosawa M, Aleksic B, Ozaki N. Early exposure to the
7 combined measles-mumps-rubella vaccine and thimerosal-containing vaccines and
8 risk of autism spectrum disorder. *Vaccine.* 2015;33:2511–2516.
- 9 84. Hooker B, Kern J, Geier D, Haley B, Sykes L, King P, et al. Methodological issues
10 and evidence of malfeasance in research purporting to show thimerosal in vaccines is
11 safe. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
- 12 85. Geier DA, Kern JK, Homme KG, Geier MR. Thimerosal exposure and disturbance
13 of emotions specific to childhood and adolescence: A case-control study in the
14 Vaccine Safety Datalink (VSD) database. *Brain Inj.* 2017;31:272–278.
- 15 86. Dorea JG. Low-dose mercury exposure in early life: Relevance of thimerosal to
16 fetuses, newborns and infants. *Curr Med Chem.* 2013;20:4060–4069.
- 17 87. Marques RC, Dórea JG, Fonseca MF, Bastos WR, Malm O. Hair mercury in breast-
18 fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines. *Eur J Pediatr.* 2007;166:935–
19 941.
- 20 88. Yin Z, Jiang H, Syversen T, Rocha JBT, Farina M, Aschner M. The methylmercury-
21 L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid
22 transporter. *J Neurochem.* 2008;107:1083–1090.
- 23 89. Roos DH, Puntel RL, Farina M, Aschner M, Bohrer D, Rocha JBT, et al. Modulation
24 of methylmercury uptake by methionine: Prevention of mitochondrial dysfunction in
25 rat liver slices by a mimicry mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;252:28–35.
- 26 90. Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health*
27 *Perspect.* 2002;110:689–694.
- 28 91. Dórea JG, Farina M, Rocha JBT. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): A

- 1 comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol.* 2013;33:700–711.
- 2 92. Farina M, Avila DS, Da Rocha JBT, Aschner M. Metals, oxidative stress and
3 neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int.*
4 2013;62:575–594.
- 5 93. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds.
6 *Crit Rev Toxicol.* 2006;36:609–662.
- 7 94. Hewett SJ, Atchison WD. Effects of charge and lipophilicity on mercurial-induced
8 reduction of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated nerve terminals of the rat. *Toxicol Appl*
9 *Pharmacol.* 1992;113:267–273.
- 10 95. Ramanathan G, Atchison WD. Ca^{2+} entry pathways in mouse spinal motor neurons
11 in culture following in vitro exposure to methylmercury. *Neurotoxicology.*
12 2011;32:742–750.
- 13 96. Ueha-Ishibashi T, Oyama Y, Nakao H, Umebayashi C, Nishizaki Y, Tatsuishi T, et
14 al. Effect of thimerosal, a preservative in vaccines, on intracellular Ca^{2+}
15 concentration of rat cerebellar neurons. *Toxicology.* 2004;195:77–84.
- 16 97. Rush T, Hjelmhaug J, Lobner D. Effects of chelators on mercury, iron, and lead
17 neurotoxicity in cortical culture. *Neurotoxicology.* 2009;30:47–51.
- 18 98. Zimmer B, Lee G, Balmer N V., Meganathan K, Sachinidis A, Studer L, et al.
19 Evaluation of developmental toxicants and signaling pathways in a functional test
20 based on the migration of human neural crest cells. *Environ Health Perspect.*
21 2012;120:1116–1122.
- 22 99. Schafer DP, Stevens B. Microglia function in central nervous system development
23 and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7.
- 24 100. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous
25 system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol.* 2011;7:47–53.
- 26 101. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK,
27 et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell
28 entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 2014;35:33–42.

- 1 102. D’Mello C, Swain MG. Immune-to-brain communication pathways in inflammation-
2 associated sickness and depression. *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, 2017.
- 3 103. Trujillo Villarreal LA, Cárdenas-Tueme M, Maldonado-Ruiz R, Reséndez-Pérez D,
4 Camacho-Morales A. Potential role of primed microglia during obesity on the
5 mesocorticolimbic circuit in autism spectrum disorder. *J Neurochem.* 2020;1–20.
- 6 104. Cárdenas-Tueme M, Montalvo-Martínez L, Maldonado-Ruiz R, Camacho-Morales
7 A, Reséndez-Pérez D. Neurodegenerative Susceptibility During Maternal Nutritional
8 Programing: Are Central and Peripheral Innate Immune Training Relevant? *Front*
9 *Neurosci.* 2020;14:1–12.
- 10 105. Maldonado-Ruiz R, Garza-Ocañas L, Camacho A. Inflammatory domains modulate
11 autism spectrum disorder susceptibility during maternal nutritional programming.
12 *Neurochem Int.* 2019;126:109–117.
- 13 106. Maldonado-Ruiz R, Fuentes-Mera L, Camacho A. Central Modulation of
14 Neuroinflammation by Neuropeptides and Energy-Sensing Hormones during
15 Obesity. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–12.
- 16 107. Purkayastha S, Cai D. Disruption of neurogenesis by hypothalamic inflammation in
17 obesity or aging. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14:351–356.
- 18 108. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B cells in the
19 multiple sclerosis central nervous system: Trafficking and contribution to CNS-
20 compartmentalized inflammation. *Front Immunol.* 2015;6.
- 21 109. Maqbool A, Lattke M, Wirth T, Baumann B. Sustained, neuron-specific IKK/NF-κB
22 activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local
23 neurodegeneration with aging. *Mol Neurodegener.* 2013;8:1.
- 24 110. Han YMY, Cheung WKY, Wong CK, Sze SL, Cheng TWS, Yeung MK, et al.
25 Distinct cytokine and chemokine profiles in autism spectrum disorders. *Front*
26 *Immunol.* 2017. 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00011>.
- 27 111. Zerbo O, Yoshida C, Grether JK, Van de Water J, Ashwood P, Delorenze GN, et al.
28 Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: The

- 1 Early Markers for Autism (EMA) study: A case-control study. *J Neuroinflammation*.
2 2014. 2014. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-113>.
- 3 112. Chen HJ, Antonson AM, Rajasekera TA, Patterson JM, Bailey MT, Gur TL. Prenatal
4 stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term
5 behavioral deficits through microbe- and CCL2-dependent mechanisms. *Transl*
6 *Psychiatry*. 2020;10:191.
- 7 113. Fernández de Cossío L, Guzmán A, van der Veldt S, Luheshi GN. Prenatal infection
8 leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring.
9 *Brain Behav Immun*. 2017;63:88–98.
- 10 114. Keren-shaul H, Spinrad A, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I, et al. A
11 Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer ' s
12 Disease Article A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development
13 of Alzheimer ' s Disease. *Cell*. 2017;169:1–15.
- 14 115. Goulder PJ, Lewin SR, Leitman EM. Paediatric HIV infection: the potential for cure.
15 *Nat Rev Immunol*. 2016;16:259–271.
- 16 116. Park JS, Pan CQ. Viral factors for HBV mother-to-child transmission. *Hepatol Int*.
17 2017;1–5.
- 18 117. Fornara C, Furione M, Arossa A, Gerna G, Lilleri D. Comparative magnitude and
19 kinetics of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses in
20 pregnant women with primary versus remote infection and in transmitting versus
21 non-transmitting mothers: Its utility for dating primary infection in pre. *J Med Virol*.
22 2016;88:1238–1246.
- 23 118. Marinho PS, Cunha AJ, Amim Junior J, Prata-Barbosa A. A review of selected
24 Arboviruses during pregnancy. *Matern Heal Neonatol Perinatol*. 2017;3:17.
- 25 119. Dammann O, Leviton A. Maternal Intrauterine Infection, Cytokines, and Brain
26 Damage in the Preterm Newborn. *Pediatr Res*. 1997;42:1–8.
- 27 120. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al.
28 Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science (80-)*. 2008;320:1647–

- 1 1651.
- 2 121. Hooper L V. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* (80-).
3 2001;292:1115–1118.
- 4 122. Björkholm B, Bok CM, Lundin A, Rafter J, Hibberd ML, Pettersson S. Intestinal
5 microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PLoS One*. 2009;4.
- 6 123. Lundin A, Bok CM, Aronsson L, Björkholm B, Gustafsson JÅ, Pott S, et al. Gut
7 flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: A tripartite communication that tunes
8 innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol*. 2008;10:1093–1103.
- 9 124. Claus SP, Tsang TM, Wang Y, Cloarec O, Skordi E, Martin F-P, et al. Systemic
10 multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes.
11 *Mol Syst Biol*. 2008;4.
- 12 125. Hejtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal
13 gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci*.
14 2011;108:3047–3052.
- 15 126. Water J, Croen L. Maternal Infection during Pregnancy and Autism Spectrum
16 Disorders. 2016;45:4015–4025.
- 17 127. Krajmalnik-Brown R, Lozupone C, Kang D-W, Adams JB. Gut bacteria in children
18 with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex
19 community influences a complex disease. *Microb Ecol Heal Dis*. 2015;26.
- 20 128. Chaidez V, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Gastrointestinal problems in children with
21 autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord*.
22 2014;44:1117–1127.
- 23 129. Isaksson J, Pettersson E, Kostrzewa E, Diaz Hejtz R, Bölte S. Brief Report:
24 Association Between Autism Spectrum Disorder, Gastrointestinal Problems and
25 Perinatal Risk Factors Within Sibling Pairs. *J Autism Dev Disord*. 2017;47:2621–
26 2627.
- 27 130. McAfoose J, Baune BT. Evidence for a cytokine model of cognitive function.
28 *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:355–366.

- 1 131. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002;40:140–155.
- 2 132. Powell CM. Neuroscience: Mum’s bacteria linked to baby’s behaviour. *Nature*.
3 2017. 2017. <https://doi.org/10.1038/nature24139>.
- 4 133. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated
5 fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation
6 of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J*
7 *Neurosci*. 2009;29:359–370.
- 8 134. Cai D, Liu T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional
9 diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1243.
- 10 135. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK,
11 et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell
12 entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2014;35:33–42.
- 13 136. Maric T, Woodside B, Luheshi GN. The effects of dietary saturated fat on basal
14 hypothalamic neuroinflammation in rats. *Brain Behav Immun*. 2014;36:35–45.
- 15 137. Henry OJ. The variability in the canine lipid profile values and its possible
16 relationship with the measurement. *Vet Zootec*. 2009;3:70–77.
- 17 138. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, et al. B Lymphocytes
18 Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production
19 of Pathogenic IgG Antibody. *Nat Med*. 2011;17:610–617.
- 20 139. Yi CX, Tschop MH, Woods SC, Hofmann SM. High-fat-diet exposure induces IgG
21 accumulation in hypothalamic microglia. *Dis Model Mech*. 2012;5:686–690.
- 22 140. Hao S, Dey A, Yu X, Stranahan AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic
23 stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun*.
24 2015;51:230–239.
- 25 141. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al.
26 Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces
27 insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146:4192–4199.

- 1 142. Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK.
2 Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic
3 Inflammation and Neuronal Function. *Cell Rep.* 2014;9:2124–2139.
- 4 143. Maldonado-Ruiz R, Cárdenas-Tueme M, Montalvo-Martínez L, Vidaltamayo R,
5 Garza-Ocañas L, Reséndez-Perez D, et al. Priming of Hypothalamic Ghrelin
6 Signaling and Microglia Activation Exacerbate Feeding in Rats' Offspring
7 Following Maternal Overnutrition. *Nutrients.* 2019;11:1241.
- 8 144. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.*
9 2007;13:460–469.
- 10 145. Chau TL, Gioia R, Gatot JS, Patrascu F, Carpentier I, Chapelle JP, et al. Are the
11 IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK- γ similarly activated? *Trends*
12 *Biochem Sci.* 2008;33:171–180.
- 13 146. Cruz-carrillo G, Montalvo-martínez L, Cárdenas-tueme M, Bernal-vega S,
14 Maldonado-ruiz R, Reséndez-pérez D, et al. Fetal Programming by Methyl Donors
15 Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in
16 Rats. 2020;14:1–15.
- 17 147. Montalvo-Martínez L, Maldonado-Ruiz R, Cárdenas-Tueme M, Reséndez-Pérez D,
18 Camacho A. Maternal Overnutrition Programs Central Inflammation and Addiction-
19 Like Behavior in Offspring. *Biomed Res Int.* 2018;2018:1–11.
- 20 148. Camacho A, Montalvo-Martinez L, Cardenas-Perez RE, Fuentes-Mera L, Garza-
21 Ocañas L. Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic
22 plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in offspring. *Behav Brain*
23 *Res.* 2017;330:46–55.
- 24 149. Neuhofer W. Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic
25 stress. *Curr Genomics.* 2010;11:584–590.
- 26 150. Pei R, Qin B, Zhang X, Zhu W, Kemper T, Ma Z, et al. Interferon-induced proteins
27 with tetratricopeptide repeats 1 and 2 are cellular factors that limit hepatitis B virus
28 replication. *J Innate Immun.* 2014;6:182–191.

- 1 151. Zhang L, Wang B, Li L, Qian DM, Yu H, Xue ML, et al. Antiviral effects of IFIT1
2 in human cytomegalovirus-infected fetal astrocytes. *J Med Virol*. 2017;89:672–684.
- 3 152. Cardenas-Perez RE, Fuentes-Mera L, de la Garza AL, Torre-Villalvazo I, Reyes-
4 Castro LA, Rodriguez-Rocha H, et al. Maternal overnutrition by hypercaloric diets
5 programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male
6 offspring. *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15:38.
- 7 153. Reed MD, Yim YS, Wimmer RD, Kim H, Ryu C, Welch GM, et al. IL-17a promotes
8 sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Nature*. 2020. 2020.
9 <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1843-6>.
- 10 154. Wurzman R, Forcelli PA, Griffey CJ, Kromer LF. Repetitive grooming and
11 sensorimotor abnormalities in an ephrin-A knockout model for Autism Spectrum
12 Disorders. *Behav Brain Res*. 2015. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.012>.
- 13 155. Park SM, Plachez C, Huang S. Sex-dependent motor deficit and increased anxiety-
14 like states in mice lacking autism-associated gene slit3. *Front Behav Neurosci*. 2018.
15 2018. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00261>.
- 16 156. Careaga M, Murai T, Bauman MD. Maternal Immune Activation and Autism
17 Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biol*
18 *Psychiatry*. 2017.
- 19 157. Kana V, Desland FA, Casanova-Acebes M, Ayata P, Badimon A, Nabel E, et al.
20 CSF-1 controls cerebellar microglia and is required for motor function and social
21 interaction. *J Exp Med*. 2019. 2019. <https://doi.org/10.1084/jem.20182037>.
- 22 158. Masi A, Breen EJ, Alvares GA, Glozier N, Hickie IB, Hunt A, et al. Cytokine levels
23 and associations with symptom severity in male and female children with autism
24 spectrum disorder. *Mol Autism*. 2017. 2017. [https://doi.org/10.1186/s13229-017-](https://doi.org/10.1186/s13229-017-0176-2)
25 [0176-2](https://doi.org/10.1186/s13229-017-0176-2).
- 26 159. Chen HJ, Antonson AM, Rajasekera TA, Patterson JM, Bailey MT, Gur TL. Prenatal
27 stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term
28 behavioral deficits through microbe- and CCL2-dependent mechanisms. *Transl*
29 *Psychiatry*. 2020. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00876-5>.

- 1 160. Ning Z, Williams JM, Kumari R, Baranov P V., Moore T. Opposite expression
2 patterns of Spry3 and p75NTR in cerebellar vermis suggest a male-specific
3 mechanism of autism pathogenesis. *Front Psychiatry*. 2019. 2019.
4 <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00416>.
- 5 161. Dong N, Chang L, Wang B, Chu L. Retinal neuronal MCP-1 induced by AGEs
6 stimulates TNF- α expression in rat microglia via p38, ERK, and NF- κ B pathways.
7 *Mol Vis*. 2014. 2014.
- 8 162. Yang Z, Wang J, Yu Y, Li Z. Gene silencing of MCP-1 prevents microglial
9 activation and inflammatory injury after intracerebral hemorrhage. *Int*
10 *Immunopharmacol*. 2016. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.016>.
- 11 163. Tian DS, Peng J, Murugan M, Feng LJ, Liu JL, Eyo UB, et al. Chemokine CCL2-
12 CCR2 signaling induces neuronal cell death via STAT3 activation and IL-1 β
13 production after status epilepticus. *J Neurosci*. 2017. 2017.
14 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0315-17.2017>.
- 15 164. Ahmad R, Al-Roub A, Kochumon S, Akther N, Thomas R, Kumari M, et al. The
16 Synergy between Palmitate and TNF- α for CCL2 Production Is Dependent on the
17 TRIF/IRF3 Pathway: Implications for Metabolic Inflammation. *J Immunol*. 2018.
18 2018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701552>.
- 19 165. Natoli R, Fernando N, Madigan M, Chu-Tan JA, Valter K, Provis J, et al. Microglia-
20 derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal
21 retinal degeneration. *Mol Neurodegener*. 2017. 2017.
22 <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0175-y>.
- 23 166. Dickens AM, Tovar-Y-Romo LB, Yoo SW, Trout AL, Bae M, Kanmogne M, et al.
24 Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to
25 inflammatory brain lesions. *Sci Signal*. 2017;10:eaai7696.
- 26 167. Xie J, Huang L, Li X, Li H, Zhou Y, Zhu H, et al. Immunological cytokine profiling
27 identifies TNF- α as a key molecule dysregulated in autistic children. *Oncotarget*.
28 2017. 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19326>.
- 29 168. Eftekharian MM, Ghafouri-Fard S, Noroozi R, Omrani MD, Arsang-jang S, Ganji

- 1 M, et al. Cytokine profile in autistic patients. *Cytokine*. 2018. 2018.
2 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.034>.
- 3 169. Yamamoto M, Horiba M, Buescher JL, Huang D, Gendelman HE, Ransohoff RM, et
4 al. Overexpression of Monocyte Chemotactic Protein-1/CCL2 in β -Amyloid
5 Precursor Protein Transgenic Mice Show Accelerated Diffuse β -Amyloid
6 Deposition. *Am J Pathol*. 2005;166:1475–1485.
- 7 170. Davalos D, Akassoglou K. In vivo Imaging of the Mouse Spinal Cord Using Two-
8 photon Microscopy. *J Vis Exp*. 2012. 5 January 2012. <https://doi.org/10.3791/2760>.
- 9 171. Potter LE, Paylor JW, Suh JS, Tenorio G, Caliaperumal J, Colbourne F, et al.
10 Altered excitatory-inhibitory balance within somatosensory cortex is associated with
11 enhanced plasticity and pain sensitivity in a mouse model of multiple sclerosis. *J*
12 *Neuroinflammation*. 2016;13:142.
- 13 172. Kalambovias J, Chen C, Khan S, Son T, Wercberger R, Headlam C, et al.
14 Development and sensory experience dependent regulation of microglia in barrel
15 cortex. *J Comp Neurol*. 2020;528:559–573.
- 16 173. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial
17 morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7.
18