



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos

Efecto de la inflamación materna en el desarrollo y función del sistema nervioso central

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

P R E S E N T A:

Biól. Uriel Pineda Solís

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leonor Pérez Martínez (IBt-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Anahí Chavarría Krauser (Facultad de Medicina-UNAM)
Dr. Víctor Julián Valdés (IFC-UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMITÉ JURADO

Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy (IBt-UNAM)

Dra. Denhi Schnabel Peraza (IBt-UNAM)

Dra. Rosa Victoria Pando Robles (INSP)

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez (IFC-UNAM)

Dra. Magdalena Guerra Crespo (IFC-UNAM)

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213316, IN213119, IN212316, IN211719) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT IFC 2016-2282).

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, muy especialmente a mi madre que me ha apoyado en mis buenas y no tan buenas decisiones, con muchos o pocos recursos siempre ha hecho lo posible por que yo salga adelante. A mi abuelita que me ha enseñado sobre la importancia del orden y los simples y pequeños detalles necesarios para la vida práctica. A mis tíos, primos y sobrinos que siempre me han motivado a creer que puedo avanzar cada vez más lejos. Los quiero.

Al Laboratorio de Neuroinmunobiología, especialmente a la Doctora Leonor Pérez quien me brindó la oportunidad para desarrollar este proyecto y siempre ha confiado en mis métodos y resultados. Al Dr Gustavo Pedraza por sus grandes aportaciones y excelentes brindadas cuando se complicaba algún procedimiento. A la Dra Martha Pedraza por enseñarme a realizar mis primeros experimentos, a Rubí con quien siempre podía compartir experiencias y obtener apoyo dentro y fuera del laboratorio, a John quien me enseñó a trabajar con ratones, con ELISAs y por todos sus consejos, al técnico académico Oswaldo López por amablemente proporcionarnos los ratones y reactivos utilizados en este proyecto, a Elisa por todos los procedimientos y protocolos que aprendí y perfeccioné, a Angie con quien aprendí a utilizar el cuarto de cultivo y por sus enseñanzas en biología molecular, a la Dra Nohemí Camacho por el gran apoyo moral en la parte final de este proceso, a Kenya por el apoyo en la realización de pruebas conductuales cuando me encontraba en dificultades físicas, a Bolivar con quien siempre podía discutir sobre temas académicos y triviales para hacer más ameno el trabajo, a Sol por sus opiniones, cuestionamientos e ideas en cada seminario. En general a todo el laboratorio, son los mejores.

A los miembros del comité tutor, especialmente a la Dra Anahí Chavarría quien nos facilitó el contacto con el INNN: a la Dra Esperanza García (Q.E.P.D.) y su laboratorio

donde se determinaron los neurotransmisores tipo catecolamina, a la Dra Sonia Galván y su laboratorio donde se determinaron los aminoácidos neurotransmisores. Al bioterio del instituto, a la MVZ Graciela Cabeza por el apoyo en el trabajo con los ratones.

Al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas por los grandes compañeros de maestría que conocí, especialmente a Axel: eres el mejor; a Brenda: mil gracias por tu amistad; a Marieli: mi casi roomie quien es mucho más que una compañera de laboratorio; a Thalía: Te quiero mucho, gracias por tantas cosas que no podría terminar de enlistar.

A la HHH Facultad de Ciencias, el mejor lugar para aprender Biología y de donde salen los mejores biólogos del mundo: a Jesús por todas las batallas compartidas pero superadas, a Mónica por las enseñanzas sobre el mundo exterior, a Dani por todos los momentos de morir de risa. Al Dr. José Luis Puente por el taller “La Biología a partir de las biomoléculas, nuevos paradigmas y aplicaciones”, gracias al cual pude conocer este grandioso instituto. A mis compañeros tallerines, actuales, anteriores y futuros.

A la familia Díaz Molina, sin ellos no hubiera sobrevivido en Cuernavaca, especialmente a la Dra Alejandra por tantas cosas que aprendí sobre la vida, siempre tendrás un lugar especial en la mía.

A mis amigos que son mi segunda familia. A Montse y Omar de quienes he aprendido muchísimas cosas y con quienes he compartido grandes experiencias que no olvidaré sin importar que estemos regados por el mundo. A mis amiguitos de la HHH ENP^o6 con quienes compartí mi adolescencia y ahora mi adultez. A la banda Z-Rock por sus sabios consejos y por enriquecerme con el mundo de la música que tanto me apasiona.

Los quiero a todos.

True love comes from more than just the heart

-Victor “Vic” Fuentes (Pierce the Veil)

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	8
Índice de figuras.....	10
Resumen	11
Abstract.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Esquizofrenia.....	14
1.2 Autismo.....	15
1.3 Desbalance en la señalización neuronal.....	16
1.4 Neuroinflamación.....	19
1.5 Neurodesarrollo	20
1.6 Activación Inmune Materna (AIM).....	22
1.6.1 Infección durante la gestación.....	22
1.6.2 Otros factores de inflamación.....	23
1.7 Modelos de estudio de AIM.....	24
1.7.1 Generalidades.....	24
1.7.2 Poly I:C.....	25
1.7.3 Desbalance de neurotransmisores en el modelo de AIM-Poly I:C.....	28
II. JUSTIFICACIÓN.....	29
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
3.1 Hipótesis.....	30
3.2 Objetivo general.....	30
3.3 Objetivos particulares.....	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1.1 Animales y tratamiento materno.....	31
4.1.2 Administración prenatal de Poly I:C.....	31
4.2 Pruebas conductuales.....	31
4.2.1 Prueba de preferencia a sacarosa.....	31
4.2.2 Test de tres cámaras.....	32
4.2.3 Campo abierto.....	33
4.3 Obtención de material biológico.....	34
4.4 Determinación de neurotransmisores.....	34
4.4.1 Monoaminas.....	34
4.4.2 Aminoácidos.....	35
4.5 Biología molecular.....	36
4.5.1 Extracción de ARN y retrotranscripción.....	36
4.5.2 PCR.....	36
4.6 Determinación de citocinas.....	38
4.6.1 ELISA en suero sanguíneo.....	38
4.6.2 ELISA en tejido cerebral.....	38

4.7 Análisis estadístico.....	38
V. RESULTADOS.....	40
5.1 Peso de hembras gestantes y su descendencia.....	40
5.2 Conducta.....	41
5.2.1 Preferencia a sacarosa (Anhedonia).....	41
5.2.2 Sociabilidad.....	44
5.2.3 Novedad social.....	45
5.2.4 Ansiedad y capacidad exploratoria.....	47
5.3 Neurotransmisores.....	50
5.3.1 Señalización dopaminérgica.....	50
5.3.1.1 Dopamina cortical.....	50
5.3.1.2 Dopamina estriatal.....	54
5.3.1.3 Dopamina hipocampal.....	56
5.3.1.4 Dopamina hipotalámica.....	59
5.3.2 Señalización noradrenérgica.....	61
5.3.2.1 Noradrenalina en hembras.....	61
5.3.2.2 Noradrenalina en machos.....	62
5.3.3 Señalización serotoninérgica.....	64
5.3.3.1 Serotonina cortical.....	64
5.3.3.2 Serotonina estriatal.....	66
5.3.3.3 Serotonina hipocampal.....	67
5.3.3.4 Serotonina hipotalámica.....	69
5.3.4 Señalización por aminoácidos.....	71
5.3.4.1 Aminoácidos en corteza.....	71
5.3.4.2 Aminoácidos en hipocampo.....	72
5.4 Perfil inflamatorio.....	74
5.4.1 Inflamación periférica.....	74
5.4.2 Inflamación central.....	75
VI. DISCUSIÓN.....	79
VII. CONCLUSIONES.....	92
VIII. PERSPECTIVAS.....	93
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	94

Lista de abreviaturas

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIM	Activación Inmune Materna
ARN	Ácido Ribonucleico
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
COMT	Catecol-orto-metiltransferasa
DA	Dopamina
DBH	Dopamina beta Hidroxilasa
DNMT	ADN Metiltransferasa
DRD2	Receptor de Dopamina D2
dRPh	Núcleo Dorsal de Rafe
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Glutamato Descarboxilasa
HCN	Canal Controlado por Nucleótidos Cíclicos Activados por Hiperpolarización
HTR	Receptor de serotonina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
HVA	Ácido Homovanílico
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de Interleucina 6
LPS	Lipopolisacárido
MAO	Monoamina Oxidasa
MeCP2	Proteína de Unión a Metil CpG 2
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero
NA	Noradrenalina

NAc	Núcleo Accumbens
NF-kB	Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras kappa de las Células B Activadas
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
OxtR	Receptor de Oxitocina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PH	Cerebro Posterior Pontino
Poly I:C	Ácido Poliriboinosínico-Poliribocitídílico
PPH	Cerebro Posterior Prepontino
RELN	Reelina
SNC	Sistema Nervioso Central
SOX10	Caja HMG Relacionada con SRY 10
STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
TH	Tirosina Hidroxilasa
TIR	Receptor de Interleucina 1/Toll
TLR3	Receptor Tipo Toll 3
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TPH2	Triptófano Hidroxilasa 2
TRIF	Adaptador que contiene el dominio TIR que induce interferón- β
VTA	Área Ventral Tegmental

Índice de figuras

Figura 1. Sistema mesocorticolímbico-estriatal.....	17
Figura 2. Sistema nervioso central y sistema inmune.....	20
Figura 3. Neuroinflamación en el desarrollo.....	21
Figura 4. Desarrollo cerebral murino y humano.....	25
Figura 5. Vía de señalización de TLR3.....	26
Figura 6. Modelo de inducción de activación inmune materna por Poly I:C.....	27
Figura 7. Peso de las ratonas gestantes.....	40
Figura 8. Ganancia de peso de la descendencia.....	42
Figura 9. Prueba de preferencia a sacarosa.....	43
Figura 10. Prueba de sociabilidad.....	45
Figura 11. Prueba de novedad social.....	46
Figura 12. Prueba de campo abierto.....	48
Figura 13. Dopamina y sus metabolitos en corteza.....	51
Figura 14. Correlación HVA-sociabilidad.....	52
Figura 15. Correlación dopamina cortical-anhedonia.....	53
Figura 16. Dopamina y sus metabolitos en estriado.....	55
Figura 17. Correlación dopamina estriatal-preferencia.....	56
Figura 18. Dopamina y sus metabolitos en hipocampo.....	57
Figura 19. Correlación dopamina hipocampal-comportamiento.....	58
Figura 20. Dopamina y sus metabolitos en hipotálamo.....	60
Figura 21. Noradrenalina en distintas zonas del cerebro.....	62
Figura 22. Correlación noradrenalina estriatal-preferencia.....	63
Figura 23. Serotonina y 5-HIAA en corteza y estriado.....	65
Figura 24. Correlación serotonina estriatal-ansiedad y exploración.....	67
Figura 25. Serotonina hipocampal y correlación con anhedonia.....	68
Figura 26. Serotonina hipotalámica y correlación con ansiedad y exploración.....	70
Figura 27. Aminoácidos en corteza.....	71
Figura 28. Aminoácidos en hipocampo.....	73
Figura 29. Correlación aminoácidos hipocampales-sociabilidad.....	74
Figura 30. Perfil inflamatorio sistémico y cerebral.....	76
Figura 31. Correlación entre citocinas pro-inflamatorias y sociabilidad.....	77

RESUMEN

Se ha establecido que afecciones neurológicas como la esquizofrenia y el autismo se originan por un incorrecto desarrollo del sistema nervioso central. La inflamación materna durante la gestación, provocada por diversos agentes infecciosos, se ha determinado como un importante factor de riesgo para interferir con el desarrollo temprano, provocando que la progenie presente estas enfermedades en su vida adulta. En el presente estudio, se utilizó un modelo murino de activación inmune materna al simular una infección viral sistémica, mediante la administración de Poly I:C durante el segundo tercio del embarazo. La descendencia adulta presentó alteraciones en el comportamiento, características de alteraciones neurológicas en humanos, tales como comportamiento antisocial, preferencia disminuida a un estímulo placentero, ansiedad y menor capacidad exploratoria. Al evaluar distintos neurotransmisores implicados en la regulación de estas respuestas en diversas zonas cerebrales que comprenden sus circuitos, encontramos déficits en las vías dopaminérgicas, de noradrenalina, serotonina y glutamato. De manera interesante, los cambios en estas vías y en los comportamientos analizados varían dependiendo del sexo de los individuos, lo cual recapitula lo que ocurre en los humanos, donde los síntomas suelen variar entre hombres y mujeres. Se correlacionó el comportamiento con la concentración de cada neurotransmisor evaluado y se determinó un perfil inflamatorio a nivel periférico y central, al evaluar diversas citocinas. De manera interesante, no se observaron cambios en el estado inflamatorio de la descendencia adulta de madres tratadas con Poly I:C con respecto a los animales control. Estos hallazgos nos permiten proponer que la inflamación materna impacta durante el periodo de desarrollo de su progenie, causando un daño a largo plazo que induce comportamientos tipo esquizofrenia-autismo en la progenie adulta.

ABSTRACT

It has been established that neurological diseases like schizophrenia and autism originate because of an improper central nervous system development. Maternal inflammation during pregnancy, induced by different infectious agents, has been determined like an important risk factor to interrupt early development, causing that adult progeny presents these diseases. In this study, we used a maternal immune activation murine model by simulating a viral systemic infection through Poly I:C administration during the second third of pregnancy. Adult offspring showed behavior alterations, characteristic of human neurological diseases, like antisocial behavior, diminished preference to a pleasurable stimulus, anxiety, and less exploratory capacity. Furthermore, we evaluated distinct neurotransmitters implicated in the regulation of these responses in different cerebral zones that comprises their circuits and we found deficits in dopaminergic, noradrenergic, serotonergic and glutamatergic pathways. Interestingly, changes in these pathways and behaviors vary depending on mice's sex. It recapitulates what occurs in humans, where symptoms are different between males and females. We correlated behavior with every neurotransmitter expression evaluated and we determined a central and peripheric inflammatory profile. However, we did not see changes in Poly I:C-treated offspring inflammatory state comparing with control. These findings allow us to propose that maternal inflammation impacts during offspring development, causing perpetual damage that induces schizophrenic-autistic behavior-like on adult offspring

I. INTRODUCCIÓN

La salud mental se define como un estado de bienestar en el cual el individuo es consciente de sus propias capacidades, puede afrontar las tensiones normales de la vida, puede trabajar de forma productiva y fructífera y es capaz de hacer una contribución a su comunidad (Escandón, 2000). La Organización Mundial de la Salud ha estimado que entre 450 y 500 millones de personas presentaron algún trastorno mental durante el 2016, entre las cuales cerca de 300 millones de personas padecen depresión, 60 millones trastorno bipolar y 21 millones esquizofrenia, además de casi un millón de muertes por suicidio reportadas cada año, todas ellas relacionadas a un trastorno mental presente en la persona al momento de su muerte. Recientemente, la ONU ha reconocido la salud mental como asunto de interés público al incluirla en los Objetivos Globales del Desarrollo Sostenible, donde se destaca el trabajar en la prevención y tratamiento de enfermedades que incluyen trastornos conductuales, neurológicos y del desarrollo humano. En México, alrededor del 18% de la población urbana en edad productiva (15-64 años de edad) sufre algún trastorno del estado de ánimo. Se estima que entre el 1 y 2% de la población adulta ha intentado suicidarse y la tasa de suicidios consumados ha aumentado de 1.1 en 1970, 2.6 en 1991, 3.5 en 2000 a 4.9 casos por cada 100 mil habitantes en 2013 (Medina-Mora, 2007; INEGI, 2015).

Diversos desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia, psicosis, depresión mayor, trastorno bipolar y desórdenes del espectro autista, así como algunas otras enfermedades neurodegenerativas, han mostrado tener orígenes múltiples: en general, se deben a una combinación entre predisposición genética y detonadores ambientales y sociales. Entre los factores de riesgo individuales, además de los componentes genéticos, se encuentran daño cerebral prenatal, nacimiento prematuro, daño y/o desnutrición al nacer, falta de vínculos

afectivos estables, aislamiento, etcétera (Garay y McAllister, 2010; FCCyT, 2018). Sin embargo, un común denominador en estos padecimientos es la alteración de distintos mecanismos inflamatorios en el sistema nervioso central (SNC). Entre estas alteraciones se incluyen inflamación crónica, ya sea sistémica o localizada, desbalance inmunológico y por supuesto perturbaciones en la activación microglial (Réus *et al.*, 2015).

1.1 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno mental que dificulta a quienes la padecen diferenciar lo que es real de lo que no, impide el pensamiento claro, las respuestas emocionales normales y generalmente las personas afectadas actúan de manera anormal en situaciones sociales (American Psychiatric Association, 2013). Se trata de una enfermedad compleja cuya causa no está totalmente determinada, se han asociado varios factores genéticos, aunque ninguno de estos ligados al sexo, pues se trata de una enfermedad que se presenta por igual en hombres y mujeres, comenzando a manifestarse típicamente durante la adolescencia o en los primeros años de la adultez, tendiendo a presentarse con menor severidad y en edades más tardías en mujeres (Freudenreich *et al.*, 2016). Se estima que a nivel mundial cerca del 1% de la población (73 millones de personas) padecen esquizofrenia, además, estos pacientes presentan un aumento de 40 al 60% en la probabilidad de morir prematuramente, sobre todo si también padecen depresión (Sullivan *et al.*, 2012).

La esquizofrenia se caracteriza por un conjunto de síntomas positivos que incluyen alucinaciones, delusiones, paranoia y desórdenes del pensamiento. También incluye síntomas negativos como son aislamiento social, anhedonia, alogia y déficit de atención. Cabe mencionar que además de los síntomas característicos anteriormente descritos, los

pacientes esquizofrénicos suelen presentar déficits cognitivos y motores, problemas de ansiedad, depresión y pensamientos suicidas, irritabilidad, dificultad para concentrarse, dormir, entender y tomar decisiones, y aislamiento en general (Meyer, 2013).

1.2 Autismo

Los trastornos del espectro autista (referidos como autismo) son una gama de trastornos neurológicos caracterizados por patrones de comportamiento repetitivos, déficit en la comunicación e interacción social y patrones característicos y restrictivos. Se habla de un espectro por el rango de síntomas, habilidades y grados de discapacidad funcional que se pueden presentar en la persona enferma (Forsberg *et al.*, 2018).

El autismo se presenta en toda la población mundial, con una prevalencia del 0.8% y mayor presencia en hombres que en mujeres (McPartland y Volkmar, 2012). En ambos casos, la enfermedad se hace evidente desde la niñez (temprana o tardía), siendo diagnosticada mediante evaluaciones de discapacidad intelectual y deficiencia del lenguaje de la persona que se sospecha padece alguna de las afecciones que comprende este espectro, el cual se estima que afecta a uno de cada 68 niños, al menos en la población estadounidense (NINDS, 2016).

Si bien no se han establecido una causa puntual para el autismo, existen diversos factores genéticos y ambientales que aumentan el riesgo de que un individuo pueda padecer alguno de estos trastornos. Al igual que la esquizofrenia, se han descubierto causas por mutaciones genéticas, las cuales curiosamente se encuentran en genes que son responsables de movilidad y señalización neuronal (OXTR, GABRB3) guía axonal (EN2, RELN) y desarrollo sináptico (PTCHD1, MECP2, BDNF, GAD1), mostrando la importancia del

correcto desarrollo temprano del SNC y su estrecha relación con enfermedades del comportamiento (Bhat *et al.*, 2014; Forsberg *et al.*, 2018).

1.3 Desbalance en la señalización neuronal

Se ha caracterizado en pacientes con estas alteraciones psiquiátricas que la concentración de diversos neurotransmisores involucrados en vías de recompensa, comportamiento social, coordinación motora, memoria, aprendizaje, etcétera, se encuentra alterada en distintas regiones del cerebro y tejido periférico (Seeman, 2009; McPartland y Volkmar, 2013; Fitzgerald, 2014; Döllén, 2015; Muller *et al.*, 2016; Howes *et al.*, 2017). La vía mesocorticolímbica-estriatal suele jugar un papel central en dichos comportamientos, ésta se compone de neuronas glutamatérgicas cuyos somas que se encuentran en la corteza prefrontal media proyectan sus axones hacia núcleos del cerebro medio, como el VTA, liberando glutamato que actúa sobre receptores NMDA típicamente excitatorios. Estos receptores se encuentran tanto en interneuronas liberadoras de GABA (el principal neurotransmisor inhibitorio) como en neuronas dopaminérgicas. Estas últimas liberan dopamina (DA) hacia zonas del estriado como el NAc y el Pallidum Ventral, donde la DA actúa sobre receptores activadores (D1 y D5) e inhibidores (D2, D3 y D4) que completan el circuito proyectando axones liberadores de DA hacia la corteza (Döllén, 2015; Howes *et al.*, 2017). Finalmente, este circuito se ve influenciado por la liberación de 5-HT proveniente del dRPh (cerebro medio) hacia el estriado, oxitocina proveniente del hipotálamo, específicamente del núcleo paraventricular, y conexiones neuronales entre la corteza y el hipocampo (Seeman, 2009; Döllén, 2015; Muller *et al.*, 2016; Howes *et al.*, 2017). Este circuito se representa en la Figura 1.

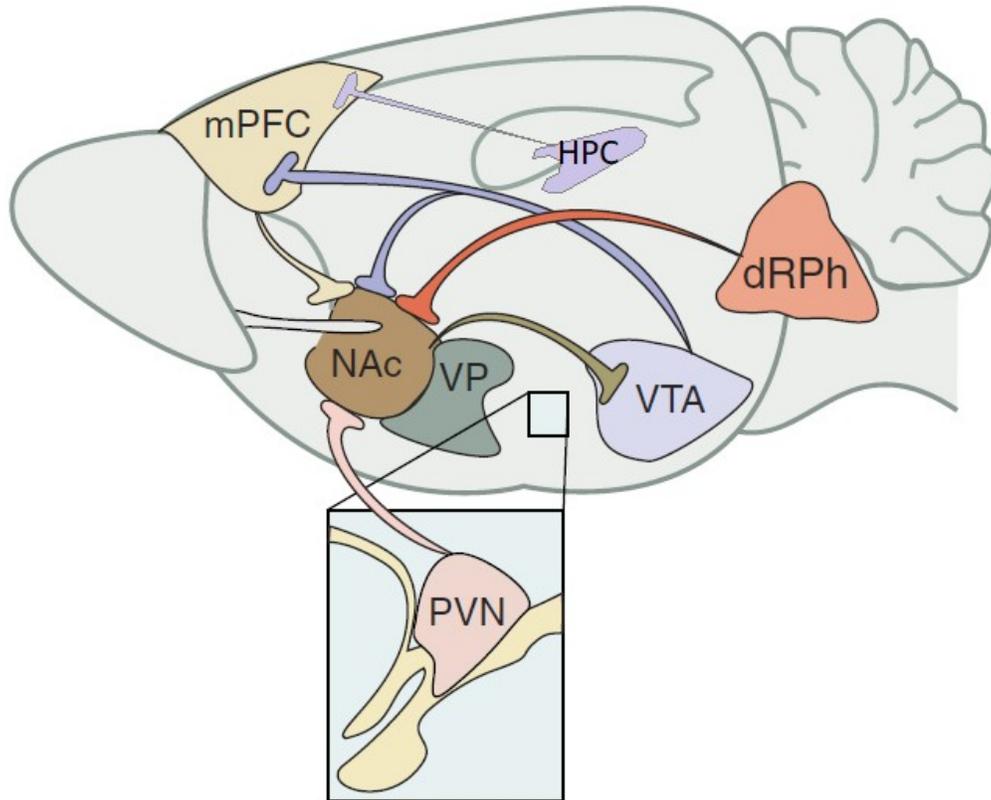


Figura 1. **Circuito mesocorticolímbico-estriatal:** Vista sagital del cerebro de ratón donde se resalta la conexión entre núcleos de neuronas de la corteza media prefrontal (mPFC) que proyectan axones hacia el estriado en el núcleo accumbens (NAc) y pallidum ventral (VP), donde envían proyecciones dopaminérgicas hacia el área ventral tegmental (VTA) en el cerebro medio, donde el núcleo dorsal de Raphe (dRPh) libera serotonina al estriado. También se resalta el núcleo paraventricular (PVN) del estriado que libera oxitocina hacia el NAc y proyecciones entre el hipocampo (HPC) y la corteza (Modificado de Döllén, 2015).

Un caso muy caracterizado es el de la hipótesis dopaminérgica en esquizofrenia. En estos pacientes se ha observado una alteración en la síntesis y liberación de DA en la zona del estriado, ligada a una disminución en la concentración de dopamina cortical y una alterada activación de los receptores tipo D1 y D2 (Howes *et al.*, 2017). En este sentido, evidencia farmacológica ha determinado que la sobre activación de receptores inhibitorios DRD2 lleva a una disminución en la actividad de receptores de glutamato, especialmente los NMDA, los cuales, al ser activados mediante diversos fármacos, disminuyen los síntomas psicóticos en pacientes con esquizofrenia (Seeman, 2009).

Adicionalmente, otro neurotransmisor derivado de dopamina, la noradrenalina (NA), se ha establecido recientemente como factor etiológico en ciertos casos de esquizofrenia, al mostrar una señalización elevada y una mayor concentración en sangre y cerebro. El aumento en la actividad noradrenérgica podría estar relacionada a una elevada susceptibilidad al estrés y daño en la memoria de trabajo (Fitzgerald, 2014).

También en pacientes autistas se ha encontrado desbalance en la señalización de neurotransmisores implicados en diversos comportamientos sociales, este es el caso de serotonina y oxitocina. La oxitocina es un neuropéptido involucrado, entre otras cosas, en el circuito de recompensa mesocorticolímbico, el cual, junto con una importante señalización dopaminérgica proveniente de diversas zonas del estriado y el cerebro medio, está implicado en la producción de sensaciones placenteras ante estímulos importantes para la supervivencia (Carter y Porges, 2013). Genes del receptor de oxitocina se han identificado como loci de susceptibilidad a autismo. Además, la administración de oxitocina intranasal en pacientes autistas mejora el desempeño cognitivo y social de los pacientes, probablemente por su acción periférica, al disminuir los niveles de cortisol, pero también de manera central al interactuar con los circuitos de recompensa mencionados anteriormente (Gregory *et al.*, 2009; Döllén, 2015).

Además de oxitocina, se ha observado la participación de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) en el área del núcleo accumbens (estriado ventral), además de otras áreas del cerebro donde actúa junto con oxitocina y DA en la función social de humanos y roedores (Döllén, 2015). Mutaciones en genes involucrados en la señalización serotoninérgica, así como deficiencias en su señalización central y exceso en la circulación periférica, se han definido como importantes factores etiológicos en el desarrollo de

autismo, no sólo por su participación en comportamientos complejos sino también por su papel en el desarrollo temprano del cerebro, por lo que una afección en su señalización ya sea en la edad temprana y/o adulta puede conllevar al desarrollo no solo de autismo sino de otros padecimientos como depresión mayor (Müller *et al.*, 2016).

1.4 Neuroinflamación

Los desórdenes psiquiátricos como depresión mayor, trastorno bipolar, esquizofrenia y autismo, se han asociado con distintos mecanismos inflamatorios, tanto en la periferia como en el SNC. Precisamente en el contexto del sistema nervioso, esta inflamación denominada “Neuroinflamación”, se ha reportado en pacientes con enfermedades psiquiátricas, donde hay un aumento de diversos marcadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas (Réus *et al.*, 2015). En la neuroinflamación, moléculas proinflamatorias (citocinas, MHC, complemento, toxinas, virus, bacterias, etcétera) provenientes de la periferia o generadas en el SNC activan células del sistema inmune (microglía en este caso). La microglía activada cumple con funciones homeostáticas en el desarrollo como la poda sináptica, sin embargo, cuando se activa de manera exacerbada, puede conducir a muerte celular o interrupción en la formación sinápsis estables (Garay y McAllister, 2010; Chen *et al.*, 2016) (Fig. 2).

En el caso de esquizofrenia y autismo, se han encontrado niveles elevados de ciertas citocinas pro-inflamatorias como son IL-6, TNF e IL-1 β , en el fluido cerebroespinal de pacientes humanos, lo cual correlaciona con el aumento en la actividad inflamatoria de microglía y astrocitos en los cerebros de estos mismos pacientes, reforzando la hipótesis de la influencia de la neuroinflamación en la etiología de los trastornos mentales (Garay y McAllister, 2010).

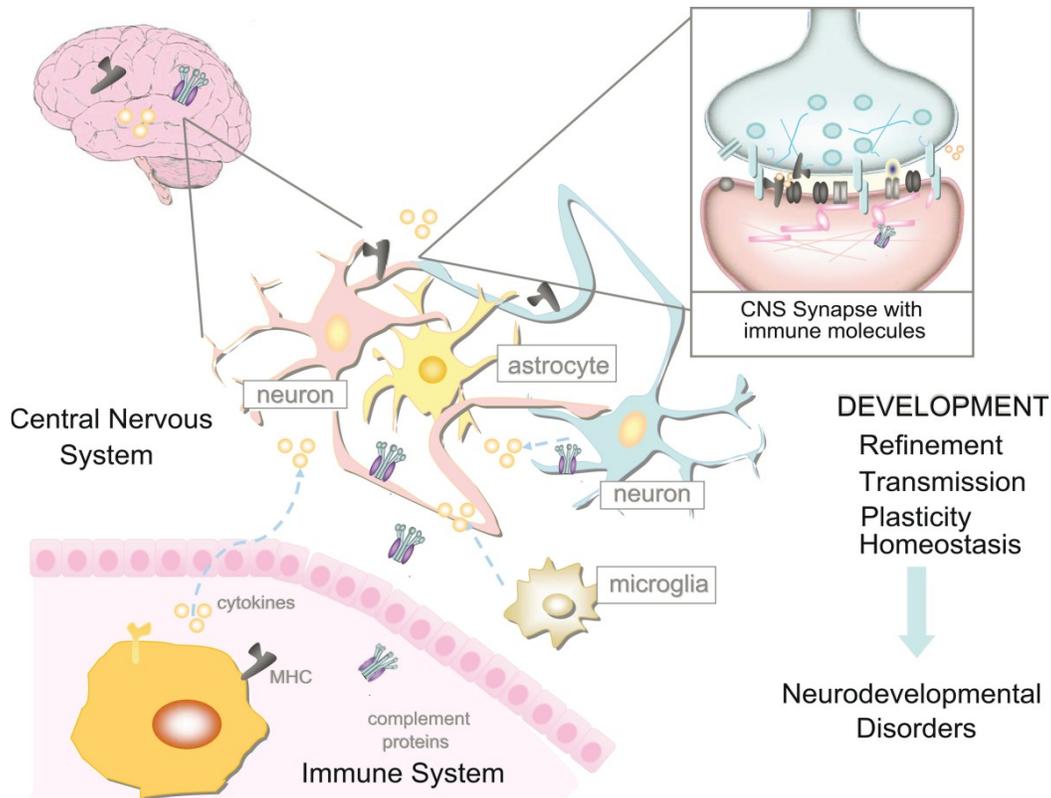


Figura 2. **Sistema nervioso central y sistema inmune:** Moléculas inmunes como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y sus receptores, vía el complemento, citocinas y quimiocinas participan en la función, refinamiento y plasticidad de sinapsis en el cerebro participando en la poda sináptica y limpia de sinápsis no funcionales. Su alteración durante el desarrollo neural puede conducir al desarrollo de enfermedades como esquizofrenia y autismo (Garay y McAllister, 2010).

1.5 Neurodesarrollo

Uno de los factores no genéticos que más influyen en la probabilidad de desarrollar alguna enfermedad como la esquizofrenia son las anomalías en el desarrollo del SNC, tal como la organización anormal de la capa cortical, alteraciones en la migración, proliferación y muerte de las células neuronales, complicaciones obstétricas, etc. (Seidman y Mirsky, 2017). Si bien hay heterogeneidad en la anatomía cerebral de los pacientes, en diversos estudios se ha identificado un reducido tamaño neuronal e incrementada la densidad celular en el hipocampo, la amígdala, el cuerpo mamilar, la corteza cingulada anterior y el septum, además de disminución en el número de células granulares y neuronas

de Purkinje en el cerebelo (McPartland y Volkmar, 2012). Es probable que la variedad en la intensidad de los síntomas de los distintos desórdenes psiquiátricos correlacione con la diversidad de las diferencias anatómicas mencionadas anteriormente y también con los distintos niveles de disfuncionalidad en diversas vías de señalización en el cerebro observadas en los pacientes, no sólo a nivel neuronal, sino también en células gliales.

Durante el desarrollo del SNC, los procesos de proliferación y migración de células neuronales y gliales, así como su consecuente muerte celular programada, formación de sinapsis, mielinización y establecimiento de circuitos neuronales, están tan altamente coordinados que alteraciones causadas por efectos neuroinflamatorios durante el embarazo pueden llevar a un “efecto dominó” que desemboque en el desarrollo de disfunciones neuronales de amplio espectro y subsecuentes alteraciones en el comportamiento juvenil o adulto de la progeie (Fig. 3) (Knuesel *et al.*, 2014).

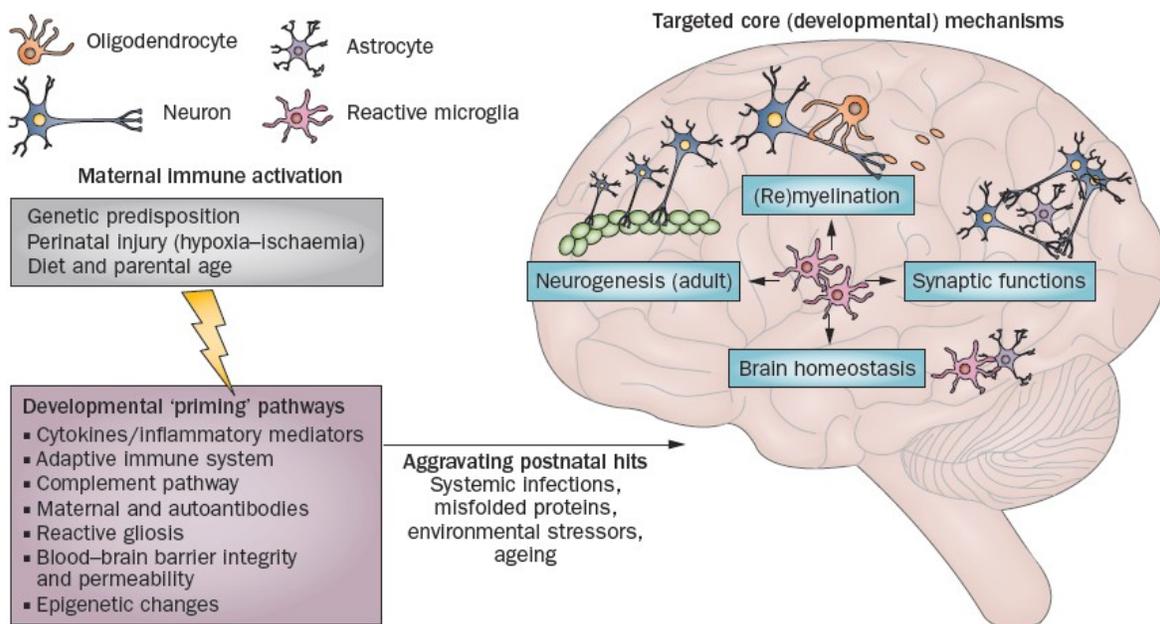


Figura 3. **Neuroinflamación en el desarrollo:** Factores genéticos y ambientales que junto con procesos neuroinflamatorios pueden afectar el correcto desarrollo del SNC, el cual requiere de una actividad inflamatoria altamente regulada por parte de células de la microglía y astrocitos. Esta inflamación puede provenir del sistema inmune materno (Tomado de Knuesel *et al.*, 2014).

1.6 Activación Inmune Materna (AIM)

1.6.1 Infección durante la gestación

La creciente evidencia que demuestra que enfermedades como esquizofrenia y autismo son desórdenes del neurodesarrollo y la influencia de la respuesta inmune exacerbada como un posible mecanismo, han llevado a la hipótesis de que la infección por algún patógeno durante el embarazo y la subsecuente respuesta inflamatoria sistémica de la madre pueden ser un factor de riesgo mayor para el desarrollo de estos padecimientos (Brown y Derkits, 2010). En años recientes se han llevado a cabo estudios epidemiológicos y traslacionales donde se ha asociado una relación entre la exposición prenatal a alguna infección y el aumento en la probabilidad de desarrollar esquizofrenia, autismo o algún otro padecimiento neurológico (Brown y Derkits, 2010; Lee *et al.*, 2015; Mazina *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016; al-Haddad *et al.*, 2019). De manera interesante, se ha descrito que el riesgo parece no ser patógeno-específico, ya que esta asociación se ha dado en agentes virales (influenza, rubeola, sarampión, polio, herpes), bacterianos (infecciones de vías urinarias, piel, genitales y aéreas) y parasitarios (*Toxoplasma gondii*) (Meyer, 2013).

En el caso de hospitalización materna por infección de cualquier tipo, se ha encontrado una importante correlación en el desarrollo de autismo independientemente del factor infeccioso (viral, bacteriano u otro), con una relación más fuerte si el proceso se da en los últimos dos trimestres y con infecciones en vías respiratorias (Lee *et al.*, 2015). En estudios de tipo meta-análisis también se ha determinado un elevado riesgo cuando se requiere hospitalización materna causada por la infección, sin embargo, en estos casos sólo se ha encontrado relación cuando la infección se da en el segundo o tercer trimestre y si se da en vías genitourinarias o en la piel, aunque también se encontró que el agente patógeno

no es específico o determinante, si bien existe una fuerte relación entre las infecciones bacterianas y de tracto genitourinario (Jiang *et al.*, 2016). El último estudio amplio en el que se analizaron datos de más de 4 millones de pacientes, vislumbró un aumento del 79% en el riesgo de diagnóstico por autismo y 24% para depresión mayor en niños y adultos expuestos a cualquier tipo de infección materna (con hospitalización), si bien no se observó aumento para casos de trastorno bipolar y un pequeño aumento del 14% de riesgo para el caso de psicosis (donde se incluyen casos de esquizofrenia), así como para el caso de muerte por suicidio (al-Haddad *et al.*, 2019). De manera interesante, el riesgo suele ser mayor cuando la infección es severa y si ésta se presenta en vías urinarias, tal como se ha reportado previamente en estudios sobre diferentes poblaciones humanas alrededor del mundo (al-Haddad *et al.*, 2019).

1.6.2 Otros factores de inflamación

Adicionalmente a los modelos de infección materna durante el embarazo, existen estudios donde se ha encontrado que condiciones de obesidad materna o diabetes mellitus gestacional también influyen en el aumento de la probabilidad de que la descendencia de la persona que la padece desarrolle autismo o algún tipo de retraso mental, no solamente en personas sino también en modelos murinos de enfermedades psiquiátricas (Rivera *et al.*, 2015, Buffington *et al.*, 2016, Connolly *et al.*, 2016). Dado que en estas condiciones se presenta un ambiente inflamatorio sistémico, similar al que se encuentra cuando hay infecciones, es probable que la inflamación como tal sea la que directamente interrumpa el correcto neurodesarrollo del feto. Para el caso de inflamación por diabetes u obesidad, esta es de bajo grado pero crónica; en el caso de infecciones, se trata de una inflamación

pasajera pero aguda, por lo que nos referiremos a este conjunto de condiciones inflamatorias como “Activación Inmune Materna”.

1.7 Modelos de estudio de AIM

1.7.1 Generalidades

Diversos grupos de investigación se han dedicado a dilucidar el mecanismo por el cual la AIM induce cambios internos en el cerebro de la progenie que conlleva a alteraciones en su comportamiento. Los modelos murinos son los más comunes dada la cantidad de información que se ha generado sobre neurogénesis y desarrollo del sistema nervioso de roedores, su facilidad para manipularlos en el laboratorio y la extrapolación que se puede hacer con respecto a los procesos que ocurren en los seres humanos (Fig. 4) (Patterson, 2011). Cabe resaltar que este tipo de estudios se comienza a llevar a cabo también en primates no humanos, observando efectos muy similares en cuanto a comportamientos descritos en pacientes humanos, dando robustez a esta línea de investigación (Bauman *et al.*, 2014).

En ratas y ratones, la infección materna se suele abordar al infectar directamente a las madres gestantes (influenza intranasal, por ejemplo) o al simular una infección al administrar moléculas que activan el sistema inmune sin necesidad de utilizar agentes patógenos. Este último enfoque es el más utilizado teniendo dos variantes principales: la inyección de ARN de doble cadena (ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico: Poly I:C), el cual evoca una respuesta inflamatoria anti-viral; y la inyección de lipopolisacárido (LPS) para el caso de infecciones bacterianas (Patterson, 2011).

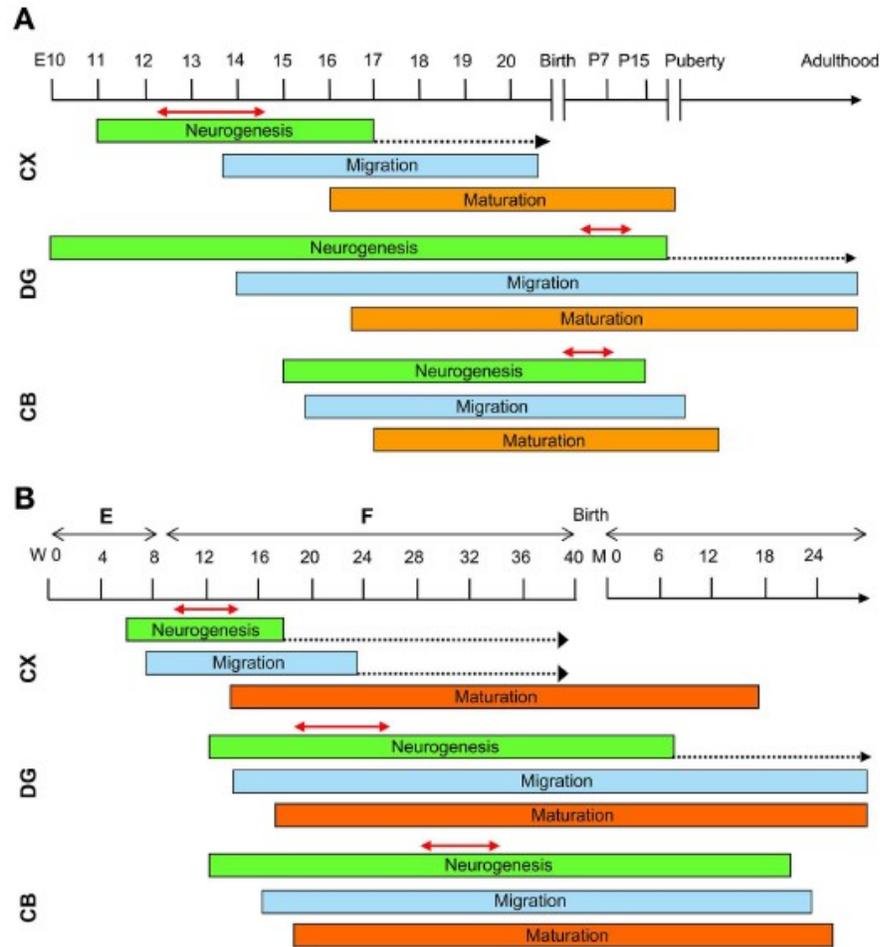


Figura 4. **Desarrollo cerebral murino y humano:** Línea del tiempo del desarrollo del cerebro: (corteza [CX], giro dentado [DG] y cerebelo [CB]) en ratones (A) y humanos (B). Las líneas rojas indican los periodos de máxima neurogénesis, mientras que las punteadas señalan los periodos donde ésta comienza a disminuir (Tomado de Stagni *et al.*, 2015).

1.7.2 Poly I:C

Como se mencionó anteriormente, el Poly I:C es un análogo de ARN de doble cadena, el cual, es generado durante las infecciones virales como un intermediario en la replicación del ARN de una cadena o como producto de transcripción simétrica en virus de ADN (Mandal *et al.*, 2011; Meyer y Feldon, 2012). El Poly I:C es reconocido como extraño por el sistema inmune de mamíferos a través de un sistema de receptores transmembranales, específicamente el receptor tipo toll 3 (TLR3) (Fig. 5). Tras la unión del Poly I:C, TLR3

estimula la liberación de factores pro-inflamatorios como IL-1 β , IL-6, TNF e interferón de tipo 1 (Mitchel *et al.*, 2014).

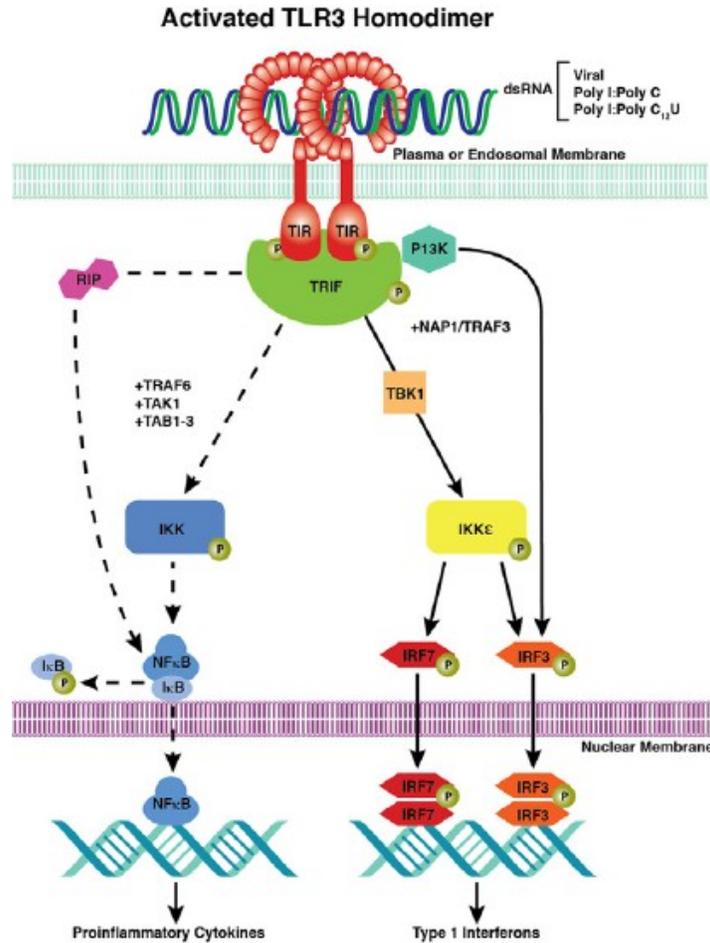


Figura 5. **Vía de señalización de TLR3:** La señalización de TLR3 comienza con la unión de TRIF al dominio TIR del homodímero TLR3, formado por la unión de su ligando (Poly I:C, por ejemplo). La línea negra indica la señalización que resulta en la producción de interferón tipo 1 a través de la fosforilación de IKKε. La línea punteada señala una vía a través de NF-κB que induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias tras la unión de RIP e IKK (Tomado de Mitchell *et al.*, 2014).

La inyección de dosis relativamente bajas de Poly I:C en roedores gestantes durante el embarazo medio a tardío por vía intravenosa o intraperitoneal, conlleva al desarrollo de comportamientos tipo esquizofrenia y/o autismo en la descendencia en ausencia de complicaciones obstétricas (Hsiao y Patterson, 2012; Malkova *et al.*, 2012). Se ha

demostrado que, tras la inyección, células de la placenta, específicamente del espongiotrofoblasto, desatan una fuerte respuesta inflamatoria a través de la liberación de citocinas que pueden señalar de forma parácrina de la placenta al feto, o bien, entrar directamente al torrente sanguíneo del feto (Meyer, 2014). Se ha descubierto un papel clave en la liberación de IL-6 dentro de las primeras 24 horas después de la inyección, donde se describe que esta citocina es la principal responsable del deterioro en el comportamiento de la descendencia, ya que la inyección de Poly I:C junto con anticuerpos que bloquean el receptor de IL-6 no tiene efecto alguno en el comportamiento de estos animales (Smith *et al.*, 2007; Hsiao y Patterson, 2011).

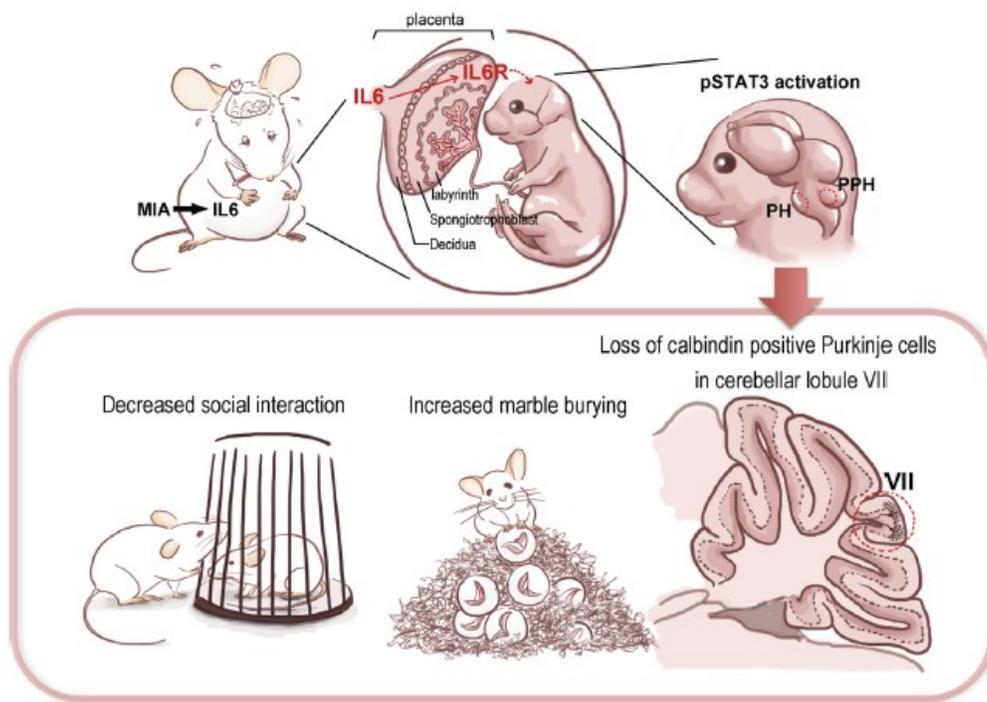


Figura 6. **Modelo de inducción de AIM por Poly I:C:** La inyección de Poly I:C desata la activación inmune materna: se libera IL-6 la cual dirige la respuesta pro-inflamatoria hacia el feto a través de su receptor en células de la placenta. Se observa activación de la vía de STAT3 en el cerebro posterior preontino (PPH) y pontino (PH). En la descendencia adulta, este insulto inflamatorio se refleja en alteraciones en el comportamiento individual y social, además de una pérdida celular cerebelar en el séptimo lóbulo del mismo (Tomado de Wu *et al.*, 2017).

Tal como lo ilustra la figura 6, recientemente se ha determinado que la acción de IL-6 depende de la transmisión de la placenta al feto, es decir, células del espongiotrofoblasto reciben la señal inflamatoria desatada por la inyección de Poly I:C en el torrente sanguíneo e inician una respuesta pro-inflamatoria hacia el feto a través de IL-6 y su receptor IL-6R (Wu *et al.*, 2017).

1.7.3 Desbalance de neurotransmisores en el modelo de AIM-Poly I:C

En pocos modelos de AIM con Poly I:C se ha determinado la influencia de algunos neurotransmisores implicados en enfermedades psiquiátricas en cerebros de la progenie afectada (Ozawa *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2009; Meyer, 2014). Se ha encontrado que el tratamiento con Poly I:C gestacional lleva a un aumento en la concentración de DA en zonas de la corteza prefrontal y el pallidum, así como un incremento de sus metabolitos de desecho (DOPAC y HVA) en estas mismas zonas y en regiones estriatales (Winter *et al.*, 2009). También se ha asociado un daño cognitivo con el incremento en el metabolismo de DA y su probable disminución en cuanto a biodisponibilidad, si bien esto se ha determinado en una variante del modelo de Poly I:C con cepas diferentes de ratones y con variaciones en cuanto a la dosis y vía de administración (Ozawa *et al.*, 2006).

Debido a la inconsistencia en estos modelos y a que la actividad de estos neurotransmisores no se ha podido asociar directamente con comportamientos alterados, es importante determinar cuál es el daño existente en las diversas vías de señalización neuronal que controlan la respuesta de ratones y humanos a determinados estímulos, detectar las regiones cerebrales en donde se interrumpen estos circuitos y explicar cómo es que la activación inmune materna influye en el funcionamiento de los mismos.

II. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la OMS determinó a los trastornos mentales como una de las primeras diez causas generadoras de discapacidad. Actualmente se ha establecido que diversas condiciones neurológicas como esquizofrenia, autismo, depresión mayor y trastorno bipolar surgen durante el desarrollo temprano donde diversos factores genéticos y ambientales irrumpen en el correcto desarrollo del SNC, afectando su funcionamiento en etapas posteriores. Uno de los factores ambientales que puede llevar a dicha irrupción es la activación del sistema inmune de la madre por un patógeno infeccioso. Se sabe que existe una fuerte asociación entre una infección materna aguda (viral o bacteriana) con el aumento en la probabilidad de que el feto desarrolle alguna de estas enfermedades en la edad adulta.

El estudiar el fenómeno de AIM en los modelos murinos que existen actualmente nos puede llevar no solo al conocimiento del o los mecanismos mediante el cual este proceso sucede, sino también al desarrollo de herramientas de diagnóstico, prevención y tratamiento para este tipo de padecimientos. Actualmente, se ha establecido que la inyección gestacional de Poly I:C es un buen modelo de AIM que lleva a comportamientos tipo esquizofrenia-autismo en la progenie adulta, sin embargo, se ha determinado muy poco de la neuroquímica involucrada en este fenómeno: no se ha asociado directamente el cambio en la concentración de neurotransmisores con los comportamientos mostrados por los ratones ni se ha distinguido entre todas las zonas cerebrales involucradas. Además, se sabe que los trastornos mentales se presentan de manera distinta dependiendo del sexo en humanos, por lo que es importante distinguir por separado entre machos y hembras en los modelos murinos, situación que no se ha tomado en cuenta en ninguno de los antecedentes presentados.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La exposición a un ambiente inflamatorio materno conduce a un desbalance en la señalización de neurotransmisores específicos que resulta en alteraciones en el comportamiento de la progenie.

3.2 Objetivo general

Determinar los cambios neuroquímicos en el cerebro de ratones sometidos a activación inmune materna y su asociación con alteraciones en el comportamiento de los mismos.

3.3 Objetivos particulares

- Evaluar el impacto de un ambiente inflamatorio durante la etapa gestacional sobre el comportamiento social e individual de la progenie.
- Determinar si un ambiente inflamatorio durante la etapa gestacional modula la concentración de neurotransmisores relacionados con el desarrollo de autismo y esquizofrenia en la progenie.
- Identificar posible actividad inflamatoria exacerbada a nivel sistémico y central en el suero sanguíneo y corteza cerebral de la descendencia.
- Determinar si los distintos comportamientos sociales e individuales de la progenie correlacionan con los niveles de neurotransmisores en áreas específicas del cerebro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Animales y tratamiento materno

Se utilizó un grupo de 12 ratonas C57BL6 de 12 semanas de edad agrupadas en cajas con 2 ratonas cada una y mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso a agua y comida ad libitum. A cada caja se le colocó un macho de la misma edad y cepa para obtener descendencia, los machos convivieron con las hembras durante sólo una noche y se confirmó actividad copulatoria por la presencia de un tapón vaginal, este día se denominó día embrionario 0.5 (E0.5).

4.1.2 Administración prenatal de Poly I:C

En el día embrionario 12 (E12) se inyectó intraperitonealmente a seis de las ratonas gestantes con 10 μ L de solución de NaCl 0.9% en agua inyectable (vehículo) por cada gramo de peso de las mismas. A las seis restantes se les inyectó con Poly I:C (potassium salt; Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 15 mg/kg de peso de acuerdo a lo reportado previamente (Meyer y Feldon 2014). El resto de la gestación se llevó a cabo de manera normal y las crías fueron destetadas tras cumplir 22 días de vida y separadas por sexo y tratamiento materno en cajas de 2 a 4 individuos. Se monitoreó el peso tanto de las crías como de las madres durante todo el experimento.

4.2. Pruebas conductuales

4.2.1 Prueba de preferencia a sacarosa

Las pruebas conductuales se practicaron en todos los ratones de la descendencia. Primero, se realizó una prueba de preferencia a sacarosa en los ratones una vez que

cumplieron 8 semanas de edad. Se colocaron los ratones en cajas grandes conteniendo 2-4 ratones cada una y se les colocaron un par de bebederos idénticos, uno de ellos con 200 mL de agua y otro con la misma cantidad de agua mas 6 gramos de sacarosa (sacarosa 3%). Durante 4 días los ratones podían elegir beber de cualquiera de los dos bebederos, los cuales se alternaron en su colocación cada día. Se registró diariamente el consumo de líquido de todas las cajas y al final de la prueba se les regresó su bebedero habitual.

4.2.2 Test de tres cámaras

Una semana de posterior a la prueba de preferencia a sacarosa, se realizó un test de tres cámaras para determinar la sociabilidad y preferencia social de acuerdo con lo establecido por Silverman y colaboradores en 2010. Primero, se acondicionó a un ratón durante un periodo de 10 minutos dentro de una caja de acrílico de 60 x 40 x 23 cm dividida en 3 secciones del mismo tamaño e interconectadas entre sí (derecha, centro, izquierda) donde el ratón podía explorar libremente todas las secciones (cámaras) a través de un par de compuertas de 4 x 6 cm. Posteriormente, se realizó la prueba de sociabilidad al colocar durante 10 minutos a un ratón desconocido de su misma edad y sexo dentro de una pequeña jaula de metal (previamente acondicionado) en una de las cámaras laterales al tiempo que se colocaba una jaula vacía en la otra cámara. Se midió el tiempo que el ratón pasaba en cada una de las tres cámaras, así como el tiempo que el ratón interactuaba oliendo directamente al ratón contenido en la jaula (tiempo de interacción). Pasados los diez minutos se confinó al sujeto experimental a la cámara central para llevar a cabo la prueba de novedad social. Se colocó un segundo ratón en la jaula vacía, permitiendo nuevamente al

ratón experimental explorar durante otros 10 minutos. Nuevamente se midieron los parámetros anteriores ahora entre las dos cámaras ocupadas.

4.2.3 Campo abierto

Se llevó a cabo una prueba de campo abierto para determinar la existencia de comportamientos tipo ansiedad y deficiencia exploratoria en alguno de los dos grupos, así como para observar la existencia de daños en la locomoción de los individuos, los cuales no deberían existir. Se utilizó una arena de acrílico con fondo oscuro y paredes transparentes de 50 x 50 x 50 cm de acuerdo a lo utilizado en estudios previos (Smith et al., 2007). Se colocó al ratón en el centro de la arena y se le permitió explorar libremente durante 5 minutos sin habituación previa. El análisis del recorrido de los ratones tanto en la prueba de campo abierto como en la de tres cámaras se realizó con el programa ANY-maze, el cual tomó como referencia la mitad anterior del animal para determinar que se encontraba dentro de alguna zona específica y a la nariz del mismo para validar una interacción directa.

Se dividió el campo en tres zonas: zona externa, zona interna y centro. El centro consiste en un cuadro de 16.6 x 16.6 cm colocado digitalmente en el centro de la arena, al analizar el recorrido se cuenta el número de veces que el ratón cruza esta área, el evitar cruzar el centro o hacerlo con una relativa alta velocidad puede ser reflejo de una conducta ansiosa por parte del individuo. La zona interna comprende un cuadrado de 30 x 30 cm también colocado al centro (incluyendo la zona “centro”) en donde se cuenta el tiempo que el ratón pasa en esta zona. La zona externa es el área periférica restante donde los ratones suelen sentirse más seguros al retraerse en las paredes. Se espera por tanto que los ratones

tratados con vehículo pasen más tiempo en la zona interna y crucen más veces el centro de la arena en comparación con los tratados con Poly I:C (Seibenhener y Wooten, 2015).

4.3. Obtención de material biológico

A las 16 semanas de edad de la descendencia, se sacrificaron los 60 ratones descendientes de las hembras gestantes tratadas con Poly I:C o vehículo: 32 vehículo (14 hembras, 18 machos) y 28 Poly I:C (14 hembras, 14 machos). El sacrificio se llevó a cabo por asfixia con CO₂, tras lo cual se extrajo alrededor de 1 mL de sangre por punción cardíaca. Posteriormente se extrajo el cerebro de cada animal, el cual fue dividido en 6 regiones: hipotálamo, estriado, hipocampo derecho, hipocampo izquierdo, corteza derecha y corteza izquierda. Cada una de las secciones fue pesada al momento de su extracción. Los tejidos fueron congelados inmediatamente en CO₂ sólido y preservados a -70°C hasta su uso. Para medir los neurotransmisores se utilizaron los cerebros de 4 ratones de cada condición (5 para machos-vehículo), para las PCR se utilizaron otros 3 ratones de cada condición y para las citocinas la corteza de otros 4 a 6 ratones de cada condición, se especifica más adelante.

4.4 Determinación de neurotransmisores

4.4.1 Monoaminas

Se determinaron los niveles de 3 neurotransmisores y sus metabolitos de desecho por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), los cuales fueron: dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y sus metabolitos: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) y ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA). Estos se

determinaron en 4 regiones distintas del cerebro: hipotálamo, estriado, un hemisferio de hipocampo y un hemisferio de corteza. El hemisferio a analizar fue elegido al azar.

El tejido se homogenizó en 500 μL de ácido perclórico 0.1 M para la corteza y 300 μL para cada uno de los demás tejidos. El homogenizado se centrifugó por 15 minutos a 8000 rpm a 4°C, el sobrenadante se filtró y se colocó en tubos limpios, los cuales se inyectaron en una columna de fase reversa previamente preparada con fase móvil. Los estándares y las muestras se corrieron por 20 minutos y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes. El protocolo se realizó de acuerdo con lo descrito por Sperk en 1982 en colaboración con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) del IMSS, en el Laboratorio de Neuroinmunología a cargo de la Doctora Esperanza García.

4.4.2 Aminoácidos

Se determinaron los niveles de 5 aminoácidos neurotransmisores por medio de HPLC acoplada a fluorescencia, estos fueron: aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA. Se midieron en el hemisferio restante de corteza e hipocampo analizados para monoaminas.

El tejido se homogenizó en 15 mL/g de tejido en una solución de metanol glacial, a partir de la cual también se extrae una fracción de proteínas. Se sonicó y centrifugó por 20 minutos a 8000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó en una relación 1:50 para las muestras de hipocampo y 1:100 para las cortezas. Finalmente, se colocaron en el cromatógrafo la fase móvil (estabilizada durante 24 horas) y 50 μL de estándares y muestra para su análisis (la inyección se realizó de forma automática). El protocolo se realizó de acuerdo con lo descrito por Piepponen y Skujins en 2001 en colaboración con el INNN, en el Laboratorio de Neuroquímica a cargo de la Dra Sonia Galván.

4.5 Biología molecular

4.5.1 Extracción de ARN y retrotranscripción

Se extrajo ARN a partir de las regiones previamente disectadas por medio del método de tiocianato de guanidina descrito por Chomczynski, 1987. Para el caso de corteza se homogenizó el tejido con 500 μL de solución D, para el resto de los tejidos 300 μL . El tejido se sonicó y se adicionaron 0.1 volúmenes de solución de acetato de sodio 2 M, un volumen de fenol, 0.2 de cloroformo-isoamilalcohol (49:1) y se centrifugó a 13 000 rpm por 20 minutos a 4°C. La fase cristalina se precipitó con isopropanol (relación 1:1), se centrifugó a 13 500 rpm por 30 minutos a 4°C y la pastilla resultante se resuspendió en 100 μL de agua DEPC y 10 μL de acetato de sodio 3 M y 200 μL de etanol absoluto. Finalmente, se centrifugó la muestra a 13 500 rpm 30 minutos a 4°C y la pastilla se lavó dos veces con 250 μL de etanol al 70% para finalmente ser resuspendida en 50-120 μL de agua tratada con DEPC y cuantificada por espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y el ARN resultante se almacenó a -70°C hasta su uso.

Una vez cuantificado el ARN, se tomó 1 μg de cada muestra y se mezcló con 10.45 μL de agua DEPC, 3 μL de Buffer RT, 1.5 μL de DTT 0.1 M (10 mM final), 0.3 μL de dNTP's 10 μM (0.2 nM final), 0.5 μL de Oligo dT 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.015 ng/ μL final) y 0.25 μL de Transcriptasa reversa (BRL) 200 U/ μL (3.3 U/mL). La mezcla de reacción se incubó a 37°C por dos horas y el cADN se almacenó a -20°C.

4.5.2 PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo al mezclar 1 μL de cADN con 1.25 μL de Buffer, 0.62 μL de MgCl_2 30 mM (1.5 μM final), 0.25 μL de dNTP's 10 mM (0.2 μM final), 0.25

μL de oligonucleótido FWD y REV 10 μM (0.2 nM final), 0.25 μL de Taq Polimerasa y 8.6 μL de agua (Volumen final 12.5 μL) en las siguientes condiciones de amplificación:

Gen	1 ciclo	35 ciclos	1 ciclo
Actina	94°C 5 minutos	94°C 30 segundos	72°C 7 minutos
		60°C 30 segundos	
		72°C 30 segundos	
TH	94°C 5 minutos	94°C 30 segundos	72°C 7 minutos
		64°C 30 segundos	
		72°C 32 segundos	
TPH2	94°C 5 minutos	94°C 30 segundos	72°C 7 minutos
		63°C 30 segundos	
		72°C 32 segundos	

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se ilustran en la siguiente tabla:

Primer	Secuencia	Tm °C	Tamaño del amplicón	Referencia
Actina FWD	GGGTCAGAAGGACTCCTATG	54.1	238 pb	Este trabajo (ID: 11461)
Actina REV	GGTCTCAAACATGATCTGGG	53.2		
TH FWD	TCCTGCACTCCCTGTCAGAG	68.15	424 pb	Roussa <i>et al.</i> , 2006 (ID: 21823)
TH REV	CCAAGAGCAGCCCATCAAAGG	68.12		
TPH2 FWD	ACTTCAACCCCTACACGCAG	66.45	470 pb	Este trabajo (ID: 216343)
TPH2 REV	CCACAACCTACCGACTGGAA	66.45		

4.6 Determinación de citocinas

4.6.1 ELISA en suero sanguíneo

La sangre extraída de los ratones fue preservada durante 2 horas a 4°C para permitir la coagulación, posteriormente se centrifugó a 1 400 rpm por 10 minutos y se extrajo el suero resultante (fase líquida), almacenándose a -70°C hasta su uso.

Se realizaron tres ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la concentración de IL-1 β , TNF e IL-6 en el suero de los animales. Se utilizó el kit ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse (BioLegend) correspondiente a cada citocina y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para la determinación de TNF se hizo una dilución 1:5 de suero en Buffer Assay 1X y una dilución 1:10 para el caso de IL-1 β e IL-6.

4.6.2 ELISA en tejido cerebral

La extracción de proteína se realizó al sonicar la corteza cerebral disectada sumergida en 1 mL de PBS pH 7.4 PMSF 0.1 mM. La muestra se centrifugó 7 minutos a 14 000 rpm a 4°C y se almacenó el sobrenadante a -70°C. Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida por el método de Bradford y se utilizaron 100 μ g de proteína para realizar la prueba de ELISA y determinar los niveles de TNF en cerebro, siguiendo el método ya descrito.

4.7 Análisis estadístico

Los valores mostrados en todos los experimentos se reportan como promedios \pm el error estándar. Se hicieron análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), de dos vías (ANOVA de dos vías) con una postprueba de Tukey, y pruebas de t de Student no pareadas (T-test) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los ratones control

(tratados con vehículo) y los tratados con Poly I:C. Para el caso de las correlaciones se utilizó un análisis de regresión lineal, el valor en la concentración de cada neurotransmisor de cada ratón se correlacionó contra el desempeño de ese mismo ratón en todas las pruebas conductuales, se muestran solamente los resultados donde la correlación fue significativa en al menos uno de los sexos. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.1. En cada figura se especifica la prueba estadística utilizada y el valor P obtenido en caso de ser estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS

5.1 Peso de hembras gestantes y su descendencia

La gestación de las ratonas se llevó a cabo de manera normal, aunque se observó una reducción no significativa en el promedio del tamaño de la camada en las ratonas inyectadas con Poly I:C (Vehículo: 8.4 ± 0.93 ; Poly I:C 5.7 ± 0.92 ; $P = 0.07$). De cualquier forma, la sobrevivencia de ambas camadas fue del 100%. En la figura 7 se muestran los pesos de las madres durante la gestación y los 22 días posteriores al nacimiento, hasta el destete de las crías. Se puede notar que a pesar de que las camadas de las ratonas inyectadas con Poly I:C resultaron menores, no hubo diferencias significativas en el peso, ni antes ni después de la inyección o tras el nacimiento de las crías.

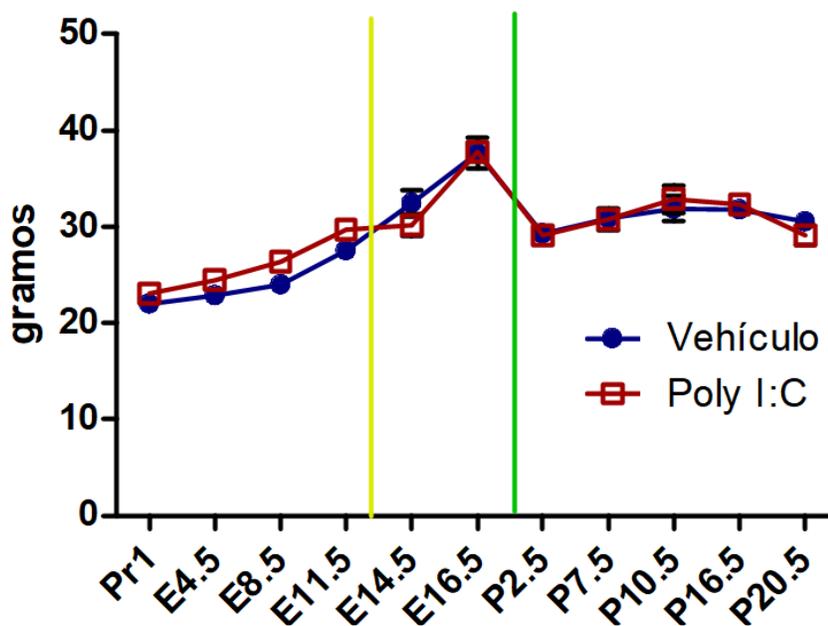


Figura 7. **Peso de las ratonas gestantes:** Seguimiento del peso de las madres desde el día anterior a la cruce (Pr1), los aproximadamente 19 días de gestación (E) y el periodo postnatal (P) hasta el destete. La línea amarilla indica el día de la inyección (E12.5) y la verde el día de nacimiento (E19.5-20.5). Vehículo n=6; Poly I:C n=6. Promedio \pm EE, área bajo la curva: ANOVA de dos vías.

También se monitoreó el peso de la descendencia a partir de su destete hasta la realización de las pruebas conductuales y en días posteriores a las mismas (Fig. 8). En todos los casos existe un aumento progresivo de peso conforme aumenta la edad de la descendencia sin ser alterado por alguna de las pruebas conductuales. La masa total es significativamente similar entre tratamientos para ambos sexos (Fig. 8C), sin embargo, al observar la ganancia semanal (diferencia entre la masa inicial al destete y la masa registrada cada semana), ésta es mayor en las hembras tratadas con Poly I:C en comparación con el control, sobre todo durante las primeras semanas de vida. Probablemente de debe a que su peso al destete fue ligeramente menor, lo cual sugiere que su peso al nacer también podría encontrarse disminuido a causa del ambiente inflamatorio durante la gestación (Fig. 8A).

5.2 Conducta

5.2.1 Preferencia a sacarosa (Anhedonia)

En el caso de la prueba de preferencia a sacarosa, la progenie (ambos sexos) derivada de madres inyectadas con vehículo presentaron una fuerte preferencia hacia beber agua con sacarosa (Fig. 9A y B). De manera similar, las hembras provenientes de madres tratadas con Poly I:C, mostraron una preferencia hacia el agua con sacarosa (Fig. 9A), cosa que no ocurre para el caso de los machos, donde el consumo de sacarosa por parte de la descendencia sometida a AIM fue mucho menor al de los tratados con vehículo (Fig. 9B). Posteriormente, se determinó el índice de preferencia a sacarosa, el cual corresponde al cociente de los mililitros de sacarosa consumidos entre el consumo total de líquido (Fig. 9C). Aquí es donde claramente se puede determinar que la preferencia hacia un estímulo placentero de los machos sometidos a inflamación materna es significativamente menor aún

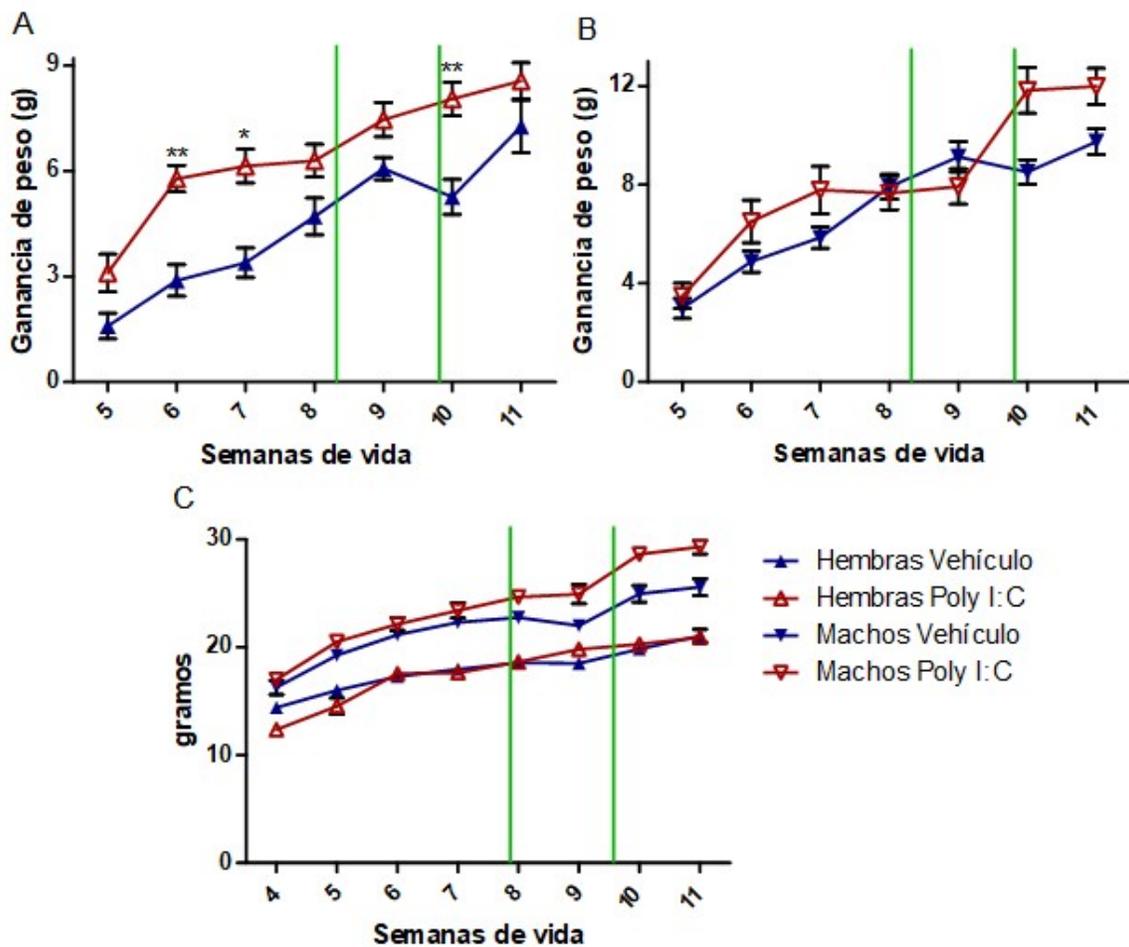


Figura 8. **Ganancia de peso de la descendencia:** Diferencia de peso de hembras (A) y machos (B) de la descendencia con respecto al momento del destete. C: Masa total de la descendencia. Las líneas verdes indican el intervalo de tiempo en que se llevaron a cabo las pruebas conductuales. Hembras vehículo n=17, hembras Poly I:C n=17, machos vehículo n=21, machos Poly I:C n=17. Promedio \pm EE, área bajo la curva: ANOVA de dos vías **P<0.01, *P<0.05.

al comparar el resultado con las hembras sometidas al mismo tratamiento. A pesar de estas diferencias, no puede afirmarse que estos ratones presentan anhedonia, ya que su índice de preferencia fue mayor a 0.6 (Promedio = 0.73 ± 0.01), un índice de preferencia de entre 0.4 y 0.6 indicaría que les es indiferente beber de cualquiera los dos líquidos, es decir, una condición total de anhedonia. Sin embargo, existe una preferencia disminuida hacia un estímulo agradable como es la sacarosa en el caso de los machos, demostrando un efecto de

la infección materna viral sobre un aspecto hedónico, el cual no había sido probado previamente. Finalmente, se evaluó el consumo total de líquido, donde el consumo de los machos sometidos a AIM fue significativamente menor al del resto de los grupos (Fig. 9D), confirmando el resultado anterior acerca de la disminución en la preferencia causada por el tratamiento con Poly I:C.

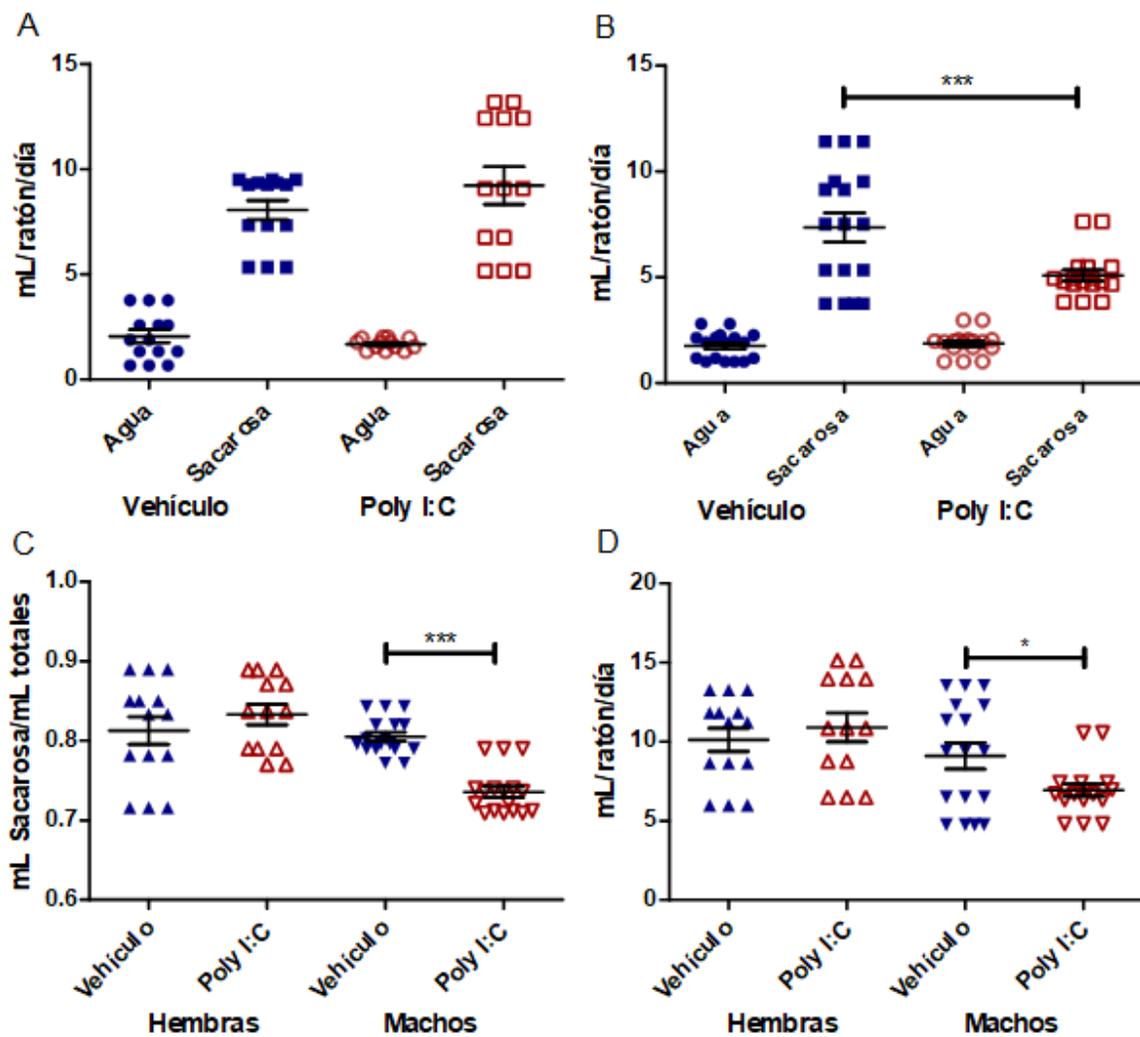


Figura 9. **Prueba de preferencia a sacarosa:** Se muestra el consumo promedio por ratón en los últimos dos días de prueba para hembras (A) y machos (B). C: Índice de preferencia de ambos tratamientos. D: Consumo total de líquido los días 3 y 4 de prueba. Cada caja albergaba de 2 a 4 individuos separados por sexo y tratamiento. Hembras vehículo n=14, hembras Poly I:C n=13, machos vehículo n=17, machos Poly I:C n=17. Promedio \pm EE, ANOVA de una vía (B) ***P<0.001. T-test (C y D) ***P<0.001, *P<0.05.

5.2.2 Sociabilidad

En la prueba de tres cámaras se determina la sociabilidad de un individuo al darle al ratón experimental la oportunidad de interactuar con una jaula ocupada o una vacía y observar el tiempo que ocupa explorando directamente cada una (tiempo de interacción) (Silverman, 2010). Se pudo notar que los ratones control interactúan durante más tiempo con la jaula que contiene al ratón desconocido (R1) que con la jaula vacía (Vacío), tal como se esperaba que sucediera. Por el contrario, en aquellos ratones tratados con Poly I:C, el tiempo de interacción con ambas jaulas fue prácticamente el mismo independientemente del sexo de los ratones. De hecho, el tiempo de interacción de los ratones vehículo con el R1 fue bastante mayor en comparación con los sometidos a inflamación materna, donde la mayor diferencia se presentó entre hembras (Fig. 10A y B).

Se determinó el índice de preferencia social, en el cual se mide la diferencia entre el porcentaje de tiempo total en el que el individuo interactúa con el ratón encerrado o la jaula vacía (Fig. 10C). Nuevamente, el índice de interacción fue menor en el caso de la descendencia tratada con Poly I:C, la cual, con un índice promedio cercano a 0.0, mostró no tener preferencia alguna por ninguno de los dos objetos, caso contrario al de aquellos ratones control que claramente mostraron una inclinación hacia interactuar con el ratón desconocido, tal como se esperaba que ocurriera debido a la naturaleza social de los ratones. Es de destacar que, a diferencia de la prueba de preferencia a sacarosa, ambos sexos mostraron un índice de interacción similar mostrando cambios estadísticamente diferentes entre los tratamientos.

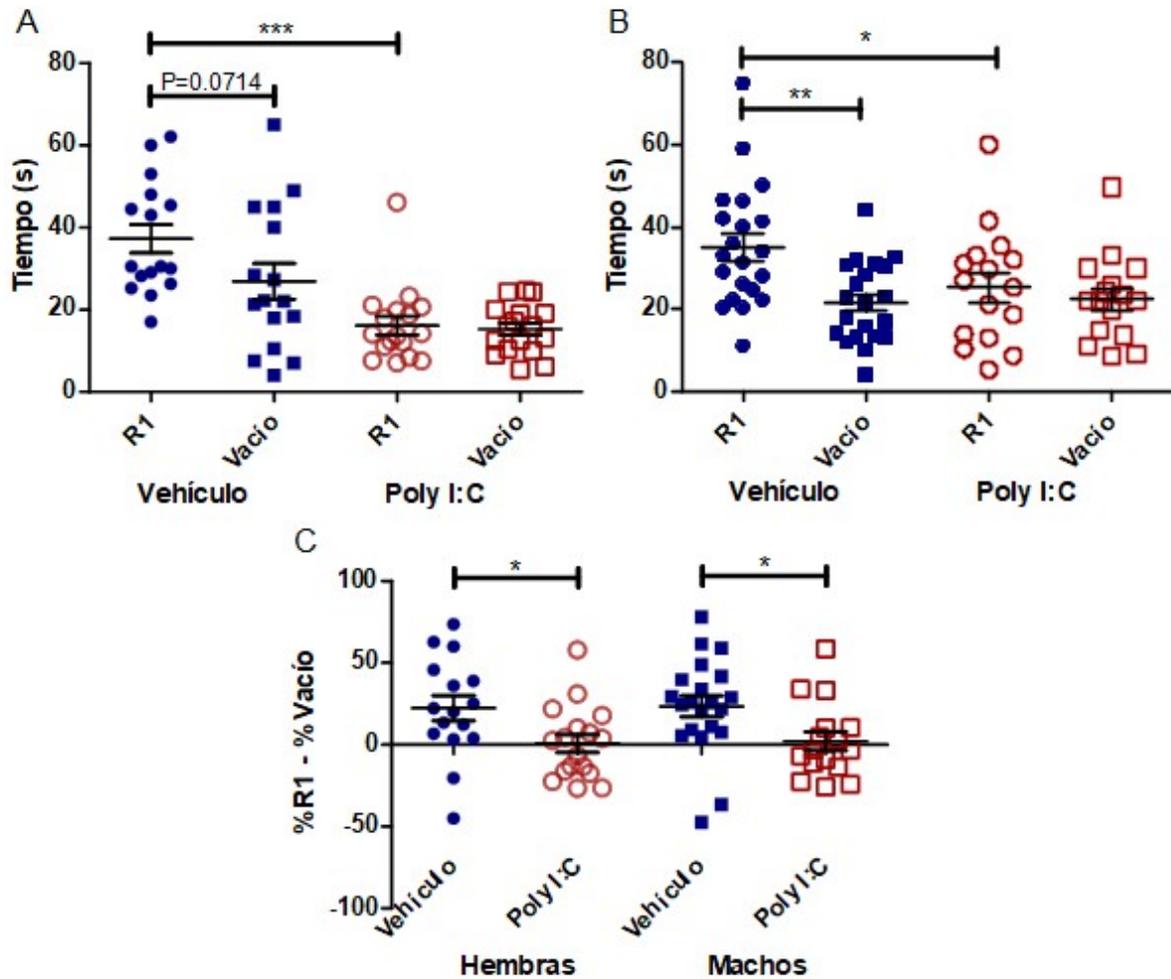


Figura 10. **Prueba de sociabilidad:** Tiempo de interacción del ratón experimental (A: hembras; B: machos) con la jaula ocupada (R1) o la jaula vacía (Vacío). C: Índice de preferencia social para ambos sexos y tratamientos. Hembras vehículo n=16, hembras Poly I:C n=17, machos vehículo n=21, machos Poly I:C n=16. Promedio \pm EE, ANOVA de una vía (A y B) ***P<0.001, **P<0.01. T-test (C) *P<0.05.

5.2.3 Novedad social

En la prueba de novedad social el ratón ahora puede elegir entre interactuar con un ratón que ya conoce por la prueba anterior (R1) o un individuo nuevo y desconocido (R2). Como se esperaba, los ratones vehículo de ambos sexos decidieron interactuar durante más tiempo con el R2 en comparación con el R1, mientras que en los tratados con Poly I:C no hubo diferencia (Fig. 11A y B). Esto se demuestra en el índice de preferencia, donde las hembras

sometidas a inflamación materna presentan en promedio un índice de preferencia de 4.78 ± 6.09 , el cual indica que no hay tendencia alguna hacia preferir la interacción con ningún ratón, incluso, el índice negativo presentado por los machos (-7.81 ± 8.01) señala una tendencia hacia la interacción con el ratón conocido, evitando olfatear al nuevo individuo (Fig. 11C). Adicionalmente, en ambos sexos de ratones tratados con Poly I:C, el tiempo de interacción con el R2 fue significativamente menor en comparación con los tratados con vehículo, nuevamente la mayor diferencia se observó en las hembras (Fig. 11A).

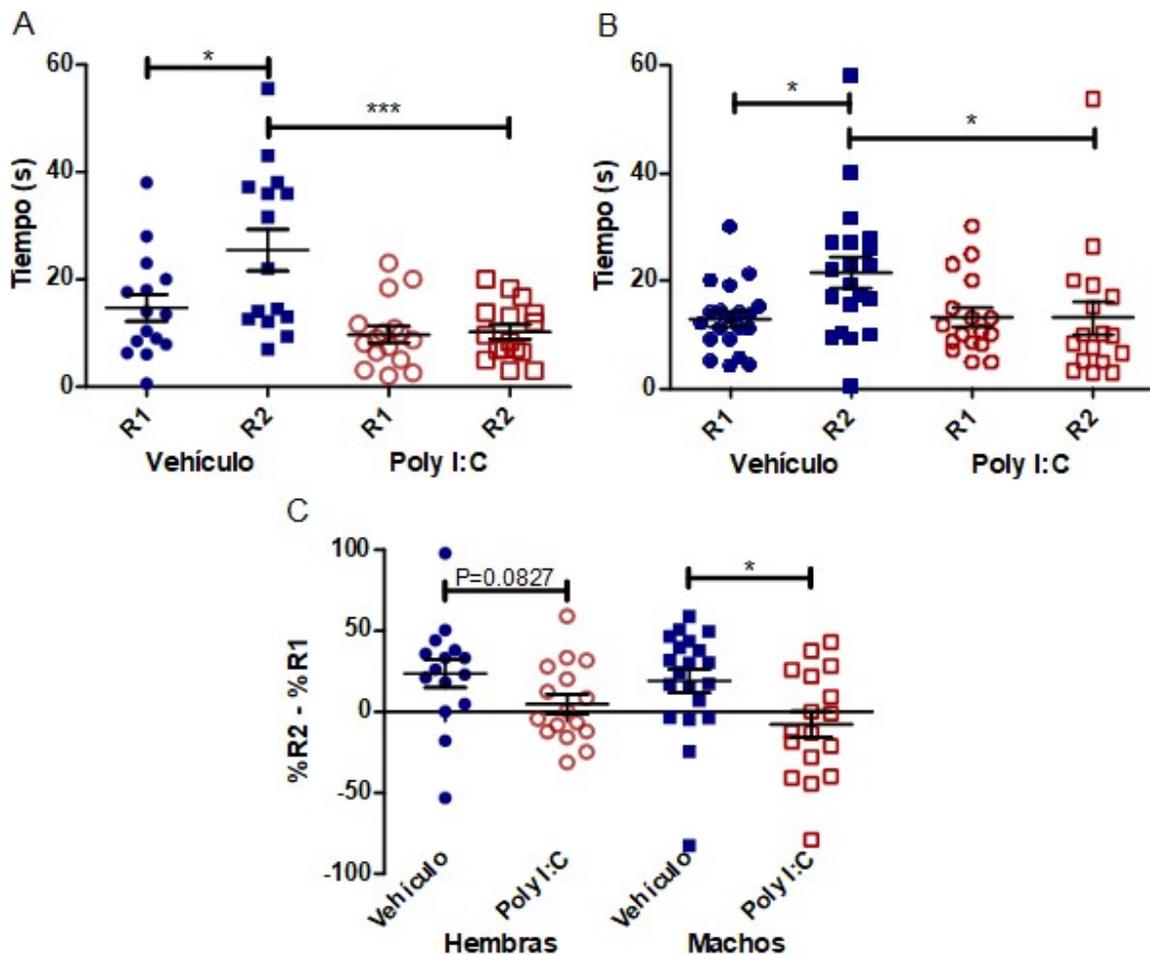


Figura 11. **Prueba de novedad social:** Tiempo de interacción del ratón experimental (A: hembras; B: machos) con el ratón conocido (R1) o con el ratón desconocido (R2). C: Índice de novedad social para ambos sexos y tratamientos. Hembras vehículo n=15, hembras Poly I:C n=16, machos vehículo n=20, machos Poly I:C n=17. Promedio \pm EE, ANOVA de una vía (A y B) ***P<0.001, *P<0.05. T-test (C) *P<0.05.

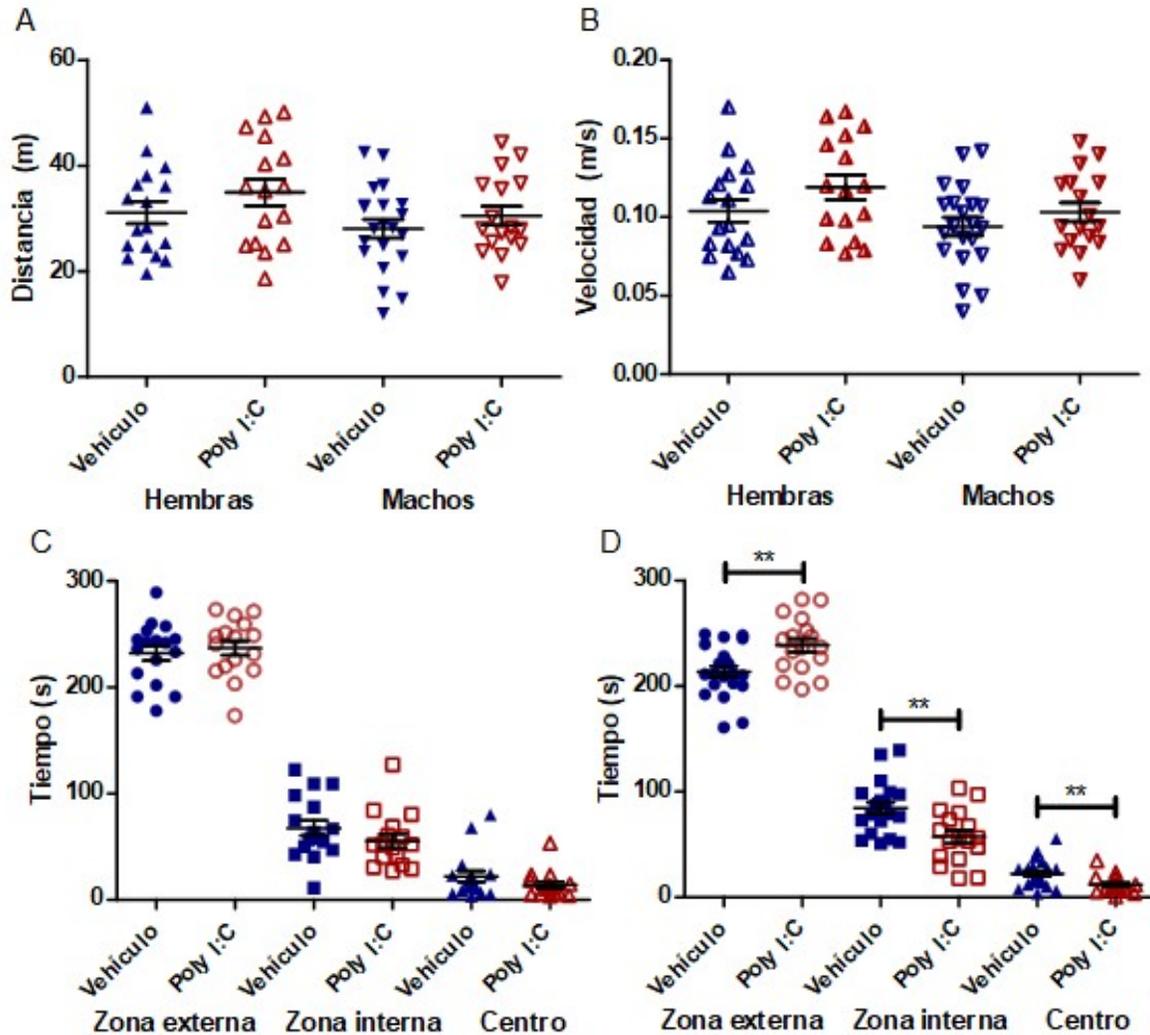
5.2.4 Ansiedad y capacidad exploratoria

En la prueba de campo abierto se coloca al ratón experimental en una caja más amplia de lo normal, donde el individuo debe decidir si mantener un comportamiento pasivo (tipo ansiedad) y retraerse en las paredes de la arena u olfatear la zona central de la misma en función de su capacidad exploratoria, capacidad motora y nivel de ansiedad basal.

No se observó déficit motor, la distancia recorrida durante toda la prueba, así como la velocidad promedio, fueron muy similares y no mostraron diferencias significativas para ambos tratamientos y sexos (Fig. 12A y B). Estas observaciones indican que los resultados obtenidos en las pruebas de sociabilidad/comportamiento no derivan de algún problema motor y reflejan el instinto del ratón hacia interactuar con alguno de los objetos sin algún impedimento físico.

En cuanto al comportamiento, las hembras de ambos tratamientos respondieron de forma similar, la mayor parte del tiempo de la prueba se mantuvieron explorando la zona externa de la arena y el tiempo de exploración dedicado a la zona interna y al centro de la misma fue prácticamente igual, demostrando que en hembras la AIM no tiene un efecto en cuanto a síntomas de ansiedad o de exploración (Fig. 12C). Por el contrario, los machos presentaron las mayores diferencias en cuanto al comportamiento dentro del campo abierto. A diferencia de las hembras, los machos sometidos a inflamación materna evitaron entrar en las zonas más expuestas del campo, se mantuvieron durante más tiempo en la periferia y el tiempo dedicado a la interacción dentro de las áreas abiertas fue significativamente menor en comparación con los controles (Fig. 12D). Además de la disminución en la capacidad exploratoria, en estos ratones se determinó una conducta ansiosa durante esta prueba: Los ratones machos sometidos a AIM recorrieron una mayor distancia en la zona

externa (lo cual correlaciona con el tiempo que se mantuvieron dentro de esta área); además, al momento de cruzar por la zona interna de la arena lo hacían con una mayor velocidad, sugiriendo que no se sentían seguros en las zonas más expuestas del campo abierto. Estas observaciones indican que la necesidad de estos ratones por recluirse en las paredes del campo se encontraba aumentada, llevándolos a evitar interactuar con las zonas abiertas, aparentemente menos seguras (Fig. 12F y H). En que un ratón se recluya durante demasiado tiempo en las paredes y evite explorar el centro del campo abierto ha sido establecido como indicador de ansiedad en roedores (Seibenhener & Wooten, 2015).



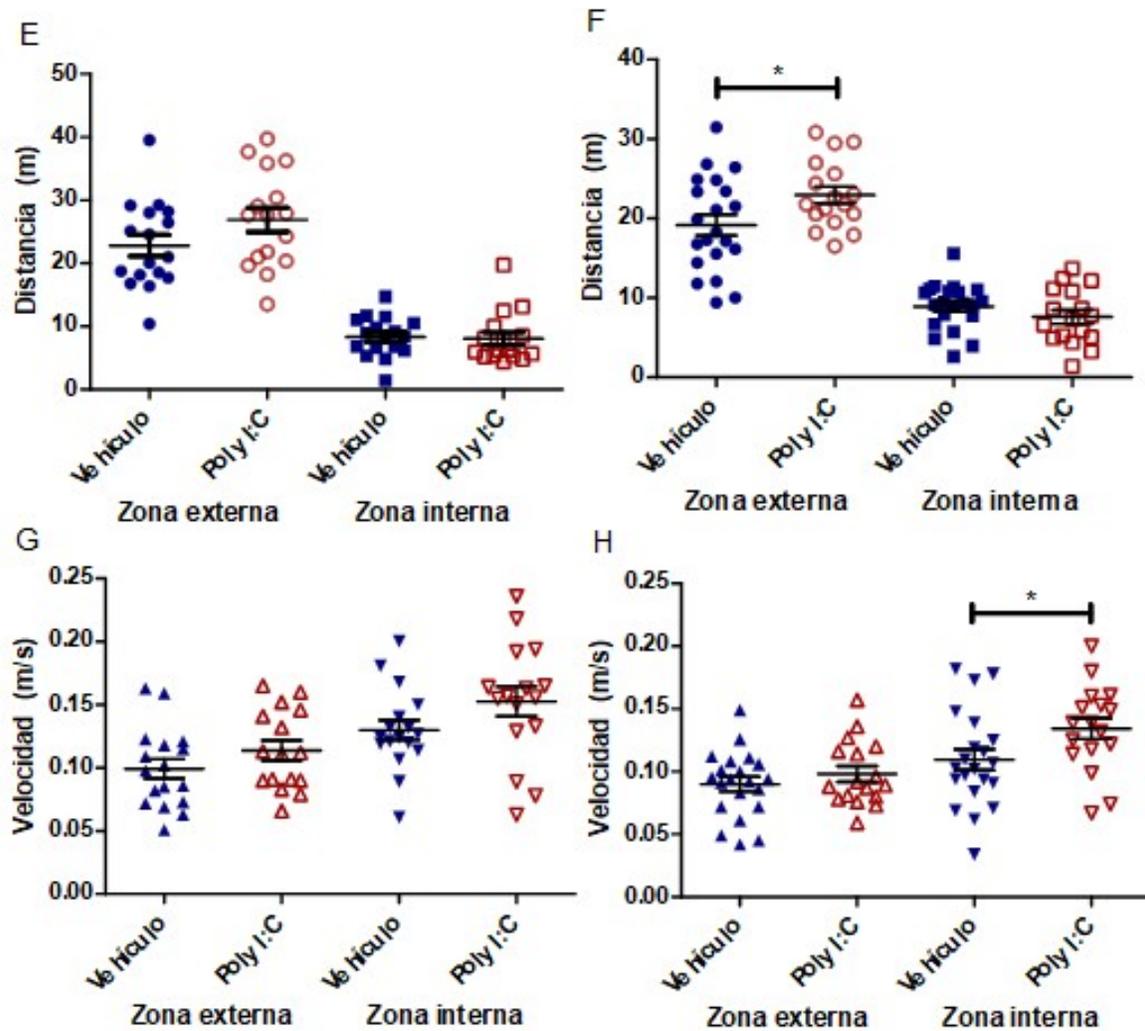


Figura 12. **Prueba de campo abierto:** A: Distancia total recorrida por los ratones en el campo abierto. B: Velocidad promedio con la que realizaron el recorrido. Tiempo que cada ratón hembra (C) y macho (D) se mantuvo en cada una de las tres zonas (el tiempo en el centro no es excluido del tiempo en la zona interna). Distancia total recorrida en las zonas interna y externa para hembras (E) y machos (F). Velocidad promedio con la que recorrieron las zonas interna y externa, hembras (G), machos (H). Hembras vehículo n=17, hembras Poly I:C n=16, machos vehículo n=21, machos Poly I:C n=17. Promedio \pm EE, T-test: **P<0.01, *P<0.05.

5.3 Neurotransmisores

5.3.1 Señalización dopaminérgica

5.3.1.1 Dopamina cortical

Se determinó la concentración de dopamina y dos de sus principales metabolitos de desecho: 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), un intermediario que se forma tras la acción de la Monoamina Oxidasa (MAO), y ácido homovanílico (HVA), el producto final de desecho, en distintas zonas del cerebro: corteza, estriado, hipocampo e hipotálamo.

Destacó la diferencia que existió en la concentración de cada neurotransmisor con respecto al sexo y la distinta afección que causó el tratamiento con Poly I:C, esto se esperaba de cierta forma por las diferencias observadas en el desempeño de las diferentes pruebas conductuales, así como por las diferencias intrínsecas de cada sexo como la producción y liberación hormonal.

En la corteza de las hembras sometidas a AIM se puede observar una alteración en el metabolismo de dopamina confirmado por las bajas concentraciones de HVA, el producto final de desecho (Fig. 13A). Debido a que los niveles de dopamina son similares, es probable que la dopamina se degrade más lentamente y se mantenga activa durante más tiempo, ya que por alguna razón no se está eliminando a un ritmo normal como el caso de los controles, tal como se ha observado en estudios similares (Ozawa *et al.*, 2006). A pesar de que en los machos existe una tendencia similar, la falta en la detección de esta molécula en un par de cerebros imposibilita aseverar si este efecto también se presentó en estos ratones (Fig. 13B). Se determinó también la expresión de Tirosina Hidroxilasa (TH) en esta zona del cerebro (Fig. 13C). Aunque se observó en cantidades similares en todos los grupos, los niveles de proteína activa no fueron determinados, por lo que no se puede

descartar una alteración en la producción de DA debido a actividad diferencial en su enzima limitante.

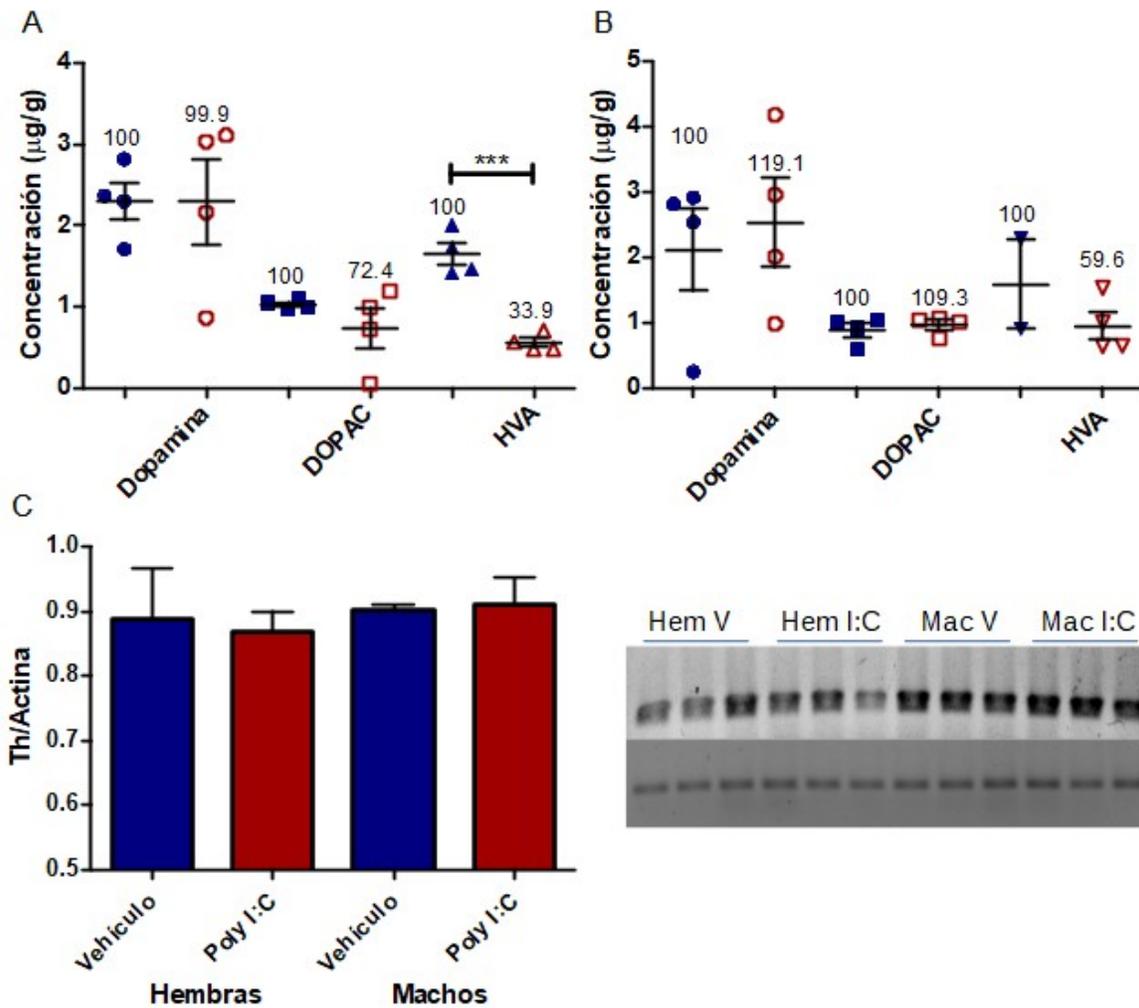


Figura 13. **Dopamina y sus metabolitos en corteza:** Concentración de dopamina, DOPAC y HVA en microgramos por gramo de tejido de corteza de hembras (A) y machos (B). C: Expresión relativa de TH normalizada a la expresión de actina en hembras (Hem) y machos (Mac). Vehículo (V) machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C (I:C) machos n=4; Poly I:C hembras n=4. PCR n=3. Promedio \pm EE. A y B: Porcentajes comparados con respecto al control. T-test: ***P<0.001.

Al hacer análisis de regresión lineal, la baja en la concentración de HVA cortical correlaciona directamente con un tiempo de interacción menor en la prueba de tres cámaras, tanto en la interacción con el ratón bajo la jaula (interacción R1) como el tiempo total en que el ratón olfateó ambos objetos (tiempo de interacción) (Fig. 14). Esta situación se

cumple para ambos sexos y sugiere que una actividad dopaminérgica prolongada en la corteza influye negativamente en la sociabilidad de los individuos sometidos a inflamación materna, así como en su capacidad exploratoria hacia un objeto nuevo.

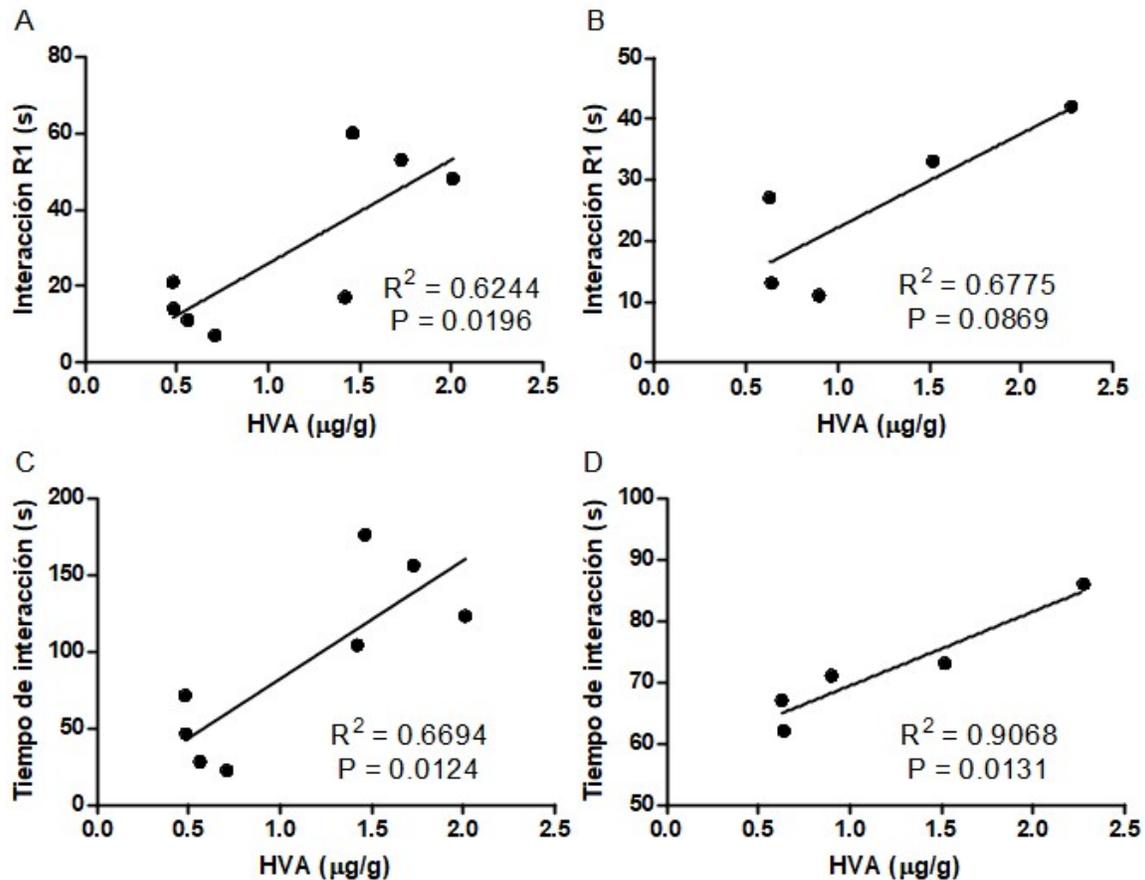


Figura 14. **Correlación HVA-sociabilidad:** Relación entre la concentración de HVA cortical con el tiempo de interacción con un ratón desconocido en hembras (A) y machos (B) durante el test de tres cámaras. Se muestra también la correlación con el tiempo total de interacción con ambos objetos (jaula ocupada y vacía) para hembras (C) y machos (D) de ambos tratamientos.

Además de la sociabilidad, la actividad dopaminérgica también se vio involucrada en la respuesta a un estímulo placentero como lo es el de la sacarosa. Esto era de esperarse debido a la participación que tiene la DA en los circuitos de recompensa del cerebro, en los cuales justamente está involucrada la corteza prefrontal (Dölen, 2015). Tras el mismo análisis de regresión lineal, se halló una correlación negativa entre la concentración de DA

y el consumo total de sacarosa en la prueba de anhedonia (Fig. 15B). El efecto fue exclusivo en machos (Fig. 15A), sin embargo, hay que recordar que sólo los animales de este sexo tratados con Poly I:C mostraron una preferencia disminuida por esta sustancia (Fig. 9B). De manera interesante, al intentar correlacionar el índice de preferencia a sacarosa con la cantidad de HVA cortical, se observa una clara correlación negativa en las hembras (Fig. 15C), recordando que en ellas fue donde no existieron diferencias significativas entre tratamientos, no así el caso de los machos (Fig. 15D).

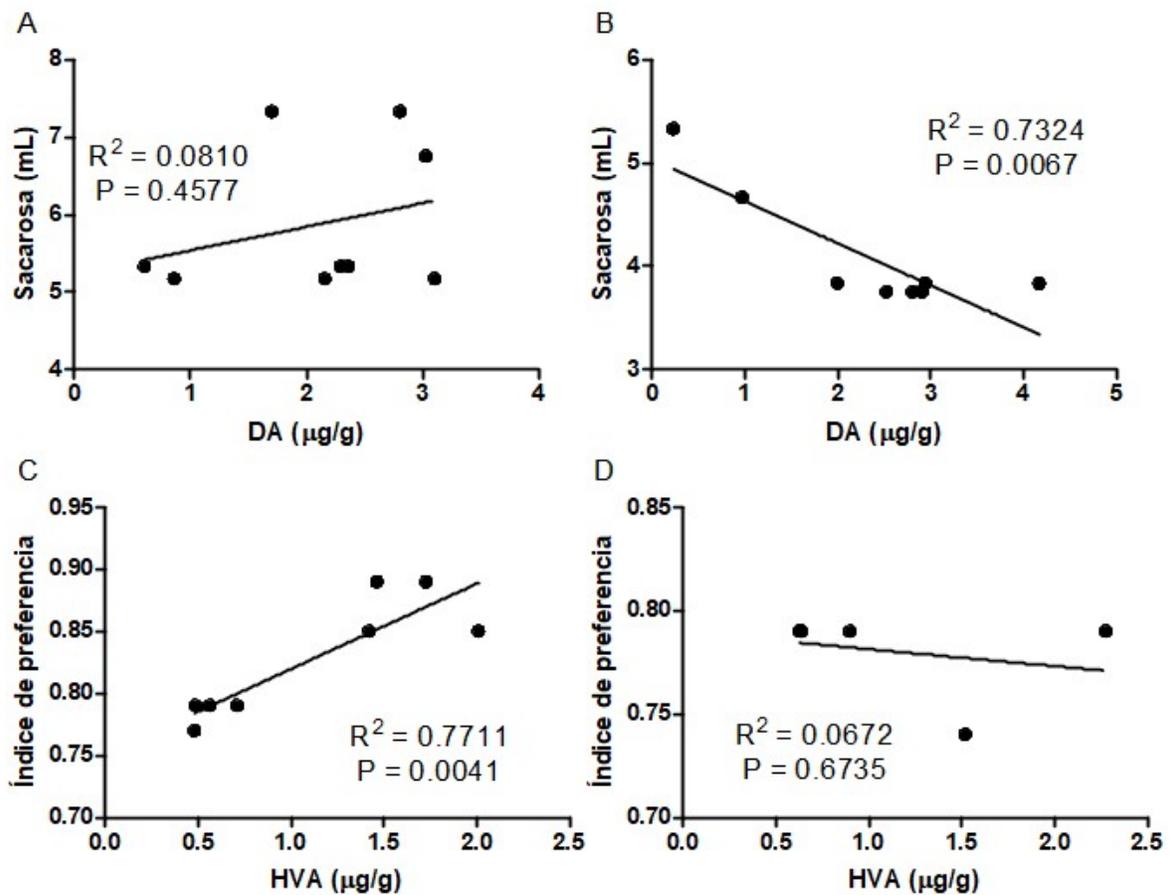


Figura 15. **Correlación dopamina cortical-anhedonia:** Relación entre la concentración de dopamina cortical con el consumo de sacarosa en hembras (A) y machos (B) durante la prueba de preferencia a sacarosa. Se muestra también la correlación de HVA con el índice de preferencia de la misma prueba para hembras (C) y machos (D) de ambos tratamientos.

5.3.1.2 Dopamina estriatal

De manera similar a la corteza, el estriado mostró diferencias en la concentración de DA dependiendo del sexo y tratamiento de los animales. El efecto más dramático se observa en la disminución en la cantidad de DA en hembras tratadas con AIM en comparación con las hembras control (Fig. 16A). Debido a que los metabolitos de desecho se detectaron en niveles similares en ambos tratamientos, es muy probable que la baja cantidad de DA estriatal en hembras sometidas a AIM sea debido a una disminución en la producción de la misma, lo cual llevaría a una menor señalización en esta zona del cerebro.

En los machos se presentó una tendencia contraria, donde los expuestos a inflamación materna tienden a mostrar una mayor concentración de DA en comparación con los controles (Fig. 16B). Los metabolitos de desecho DOPAC y HVA tuvieron concentraciones similares en ambos tratamientos. Al observar los niveles de expresión de TH en el estriado, no se encontraron diferencias claras entre tratamientos, solamente una tendencia en que la expresión en machos es menor con respecto a las hembras independiente de la condición gestacional (Fig. 16C). Sin embargo, es prudente recordar que, además de que sólo se determinó la expresión de TH en pocos animales (n=3), la actividad de una proteína no siempre está directamente relacionada con la expresión de su mensajero, por lo que no se descarta algún déficit en la producción de DA causado por alteración en la actividad de TH.

Adicionalmente, se encontró una correlación negativa entre la concentración de DA estriatal en machos y el índice de preferencia de la prueba de sociabilidad, en donde este aparente aumento en los niveles de DA en machos tratados con Poly I:C los llevaría a decidir no interactuar en dicha prueba (Fig. 17B). Esta relación no se observó en las

hembras (Fig. 17A), sin embargo, en este sexo el cambio en el metabolismo dopaminérgico tiende más a comprometer una conducta de recompensa que un comportamiento social, esto se debe a la fuerte correlación negativa que existe con la concentración de DOPAC en el estriado y el consumo de sacarosa, donde un metabolismo de DA más acelerado llevaría a una respuesta indiferente ante un estímulo placentero, situación que no ocurrió con los machos (Fig. 17C y D).

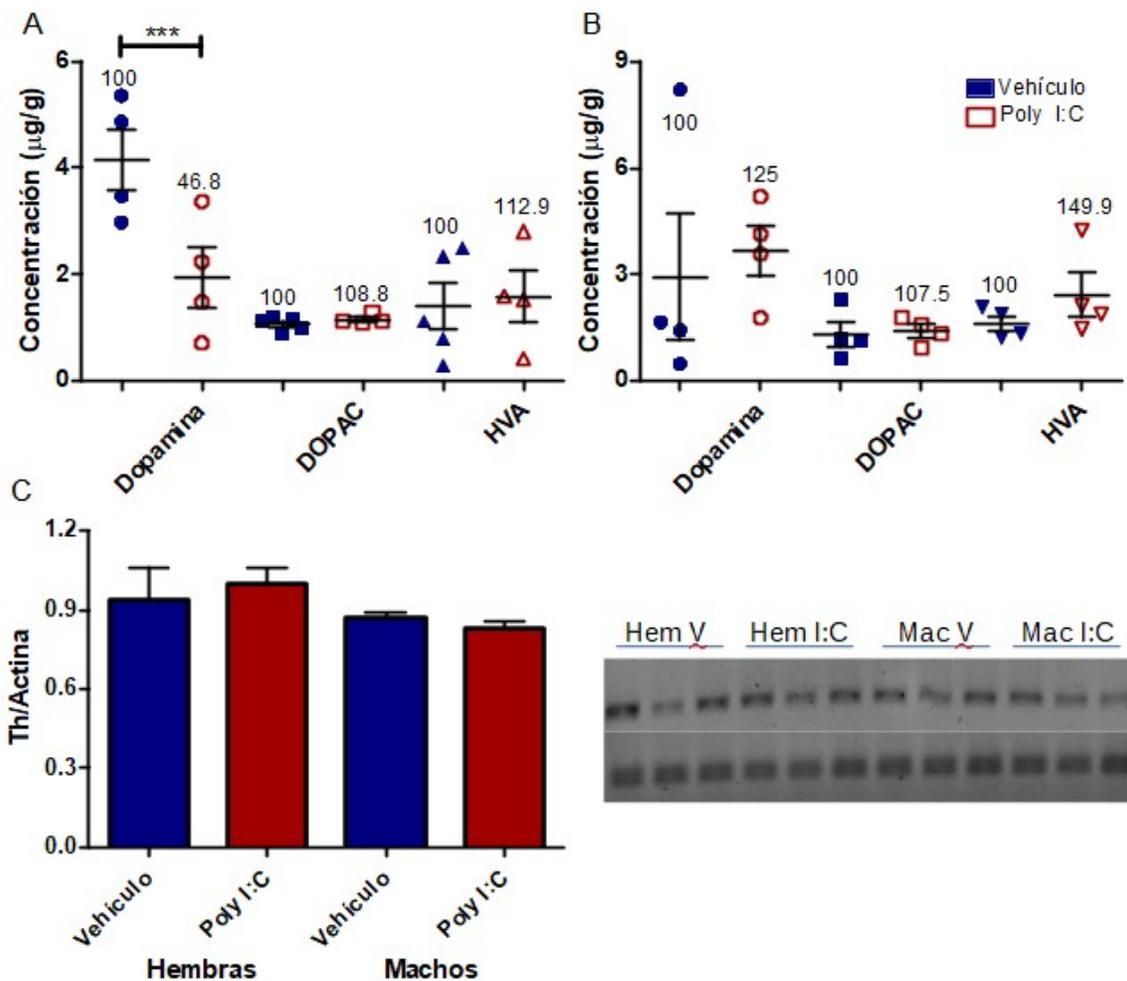


Figura 16. **Dopamina y sus metabolitos en estriado:** Concentración de dopamina, DOPAC y HVA en microgramos por gramo de tejido de estriado de hembras (A) y machos (B). C: Expresión relativa de TH normalizada a la expresión de actina. Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. PCR n=3. Promedio \pm EE. A y B: Porcentajes comparados con respecto al control. T-test: ***P<0.001.

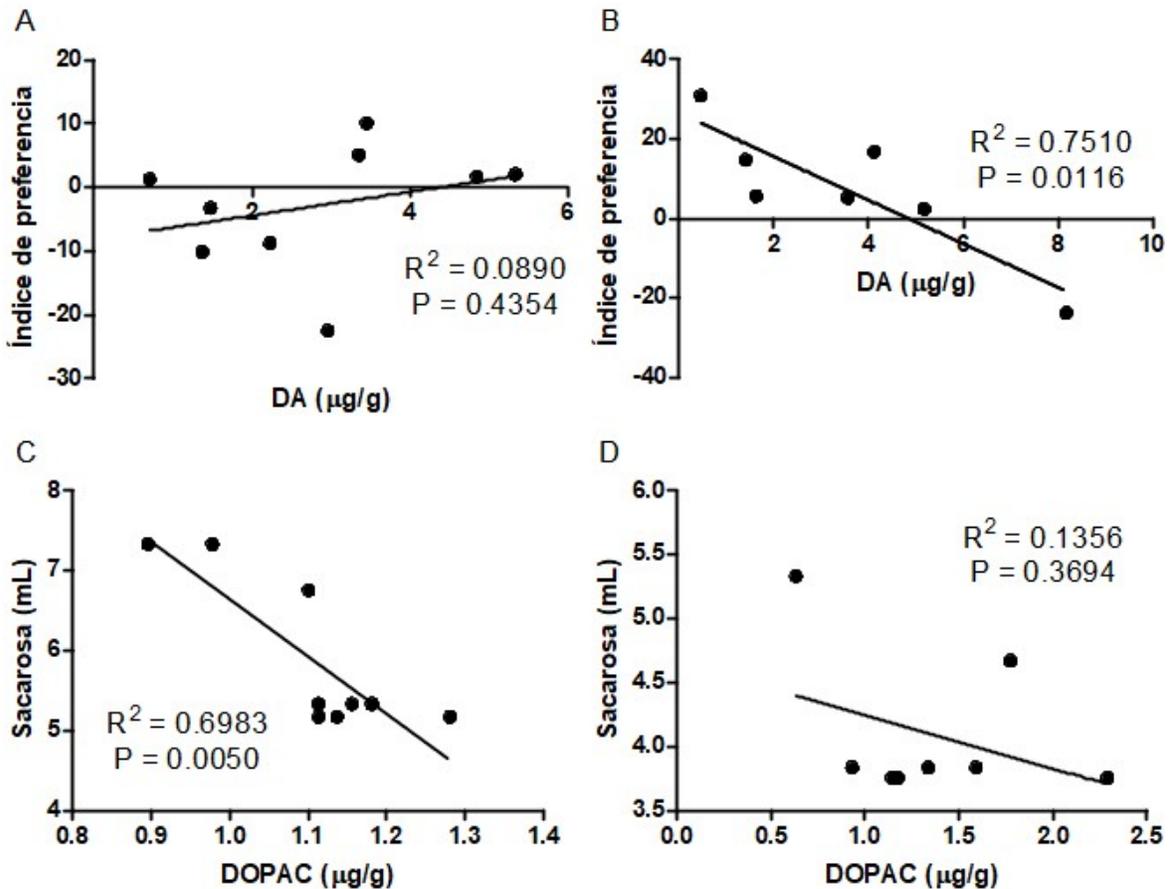


Figura 17. **Correlación dopamina estriatal-preferencia:** Relación entre la concentración de dopamina en el estriado con el índice de preferencia social en hembras (A) y machos (B) durante la prueba de tres cámaras. Se muestra también la correlación de DOPAC con el consumo de sacarosa para hembras (C) y machos (D) de ambos tratamientos en la prueba de anhedonia.

5.3.1.3 Dopamina hipocampal

El hipocampo de las hembras sometidas a AIM no mostró ninguna diferencia en cuanto al metabolismo de dopamina, aunque probablemente éste sea más lento debido a la tendencia en la disminución de HVA en ratonas tratadas con Poly I:C (Fig. 18A). En este caso los machos mostraron la mayor diferencia: aquellos bajo el paradigma de inflamación materna mostraron muy altas concentraciones de HVA al compararlos con los controles y nula presencia de dopamina, lo que claramente indica que este neurotransmisor se está

degradando demasiado rápido y probablemente tenga muy poca biodisponibilidad y señalización, por su corta vida media de 2 minutos (Pubchem) (Fig. 18B), sin embargo, no se descarta algún fallo en la detección de DA en estas muestras. En este caso no fue posible determinar la expresión de TH en ninguno de los sexos o tratamientos, probablemente por la poca producción dopaminérgica en el hipocampo, el cual suele solamente recibir pulsos de dopamina de regiones aledañas, como la corteza.

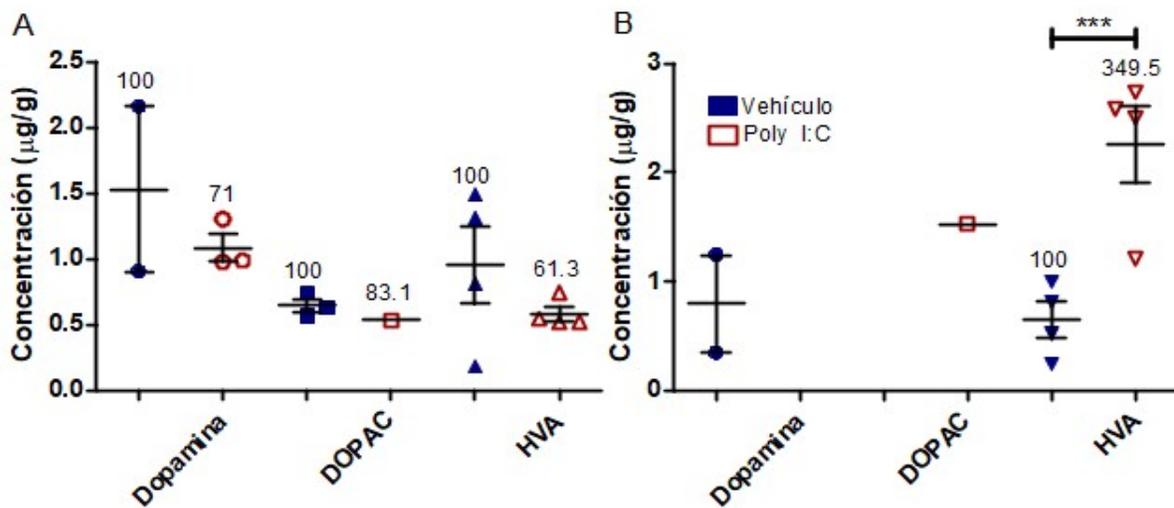
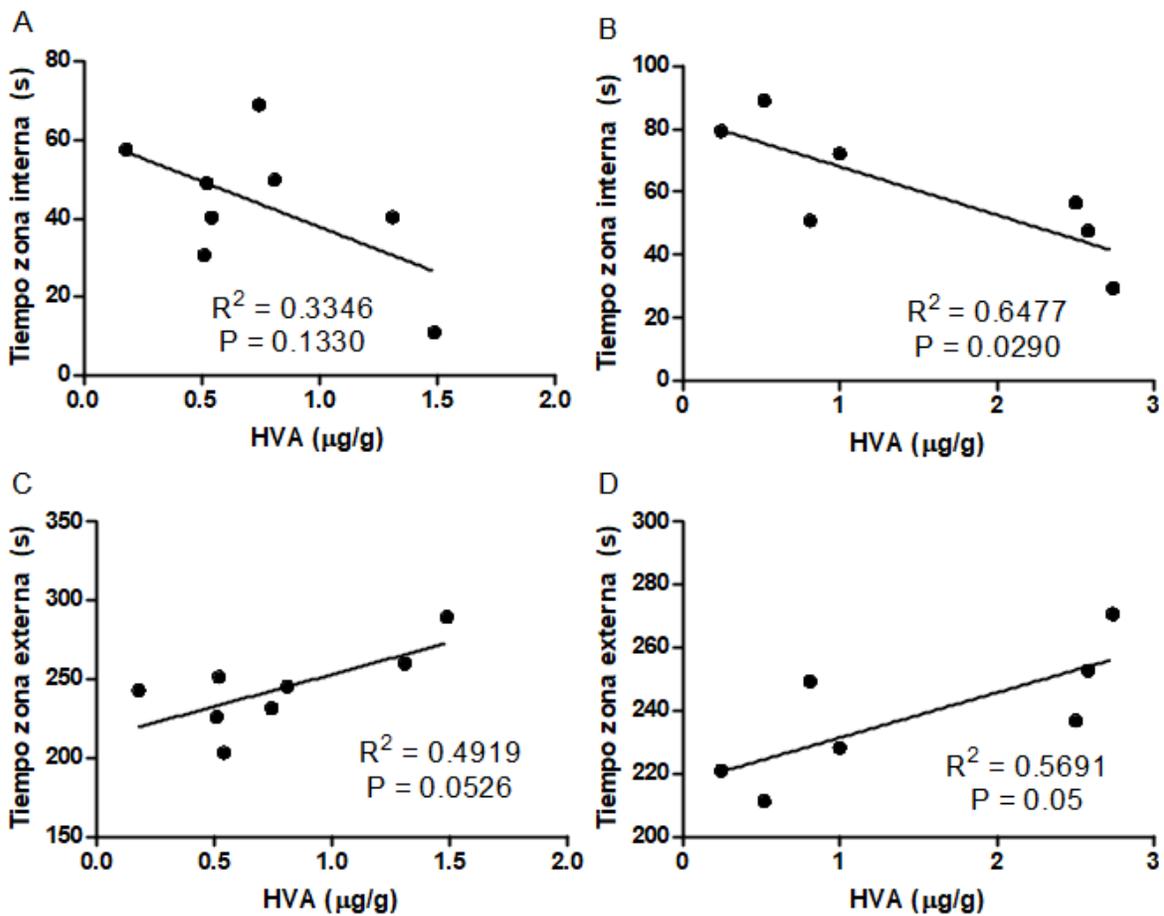


Figura 18. **Dopamina y sus metabolitos en hipocampo:** Concentración de dopamina, DOPAC y HVA en microgramos por gramo de tejido de hipocampo de hembras (A) y machos (B). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. Promedio \pm EE. Porcentajes comparados con respecto al control. T-test: ***P<0.001.

De modo interesante, estas concentraciones de HVA hipocampal en machos correlacionan fuertemente con su desempeño observado en la prueba de campo abierto, donde los mayores niveles de este metabolito corresponden a un menor tiempo de exploración en la zona interna del campo y un mayor interés por mantenerse en la zona externa (Fig. 19B y D), recordando el aumento del 350% en aquellos expuestos a AIM (Fig. 18B). Curiosamente, en las hembras parece existir la misma correlación entre HVA y tiempo de exploración en cada zona del campo abierto a pesar de que en el hipocampo no

hubo diferencias entre tratamientos en cuanto a la concentración de este metabolito y tampoco hubo diferencias significativas en la prueba de campo abierto (Fig, 19A y C).

Además del desempeño en el campo abierto, la concentración de HVA en el hipocampo, se encuentra positivamente asociado a la conducta social de las hembras, ya que bajos niveles de este ácido correspondieron a un menor tiempo de interacción social y total en la prueba de tres cámaras, donde las hembras tratadas con Poly I:C mostraron la menor sociabilidad y tendencia a menores concentraciones de HVA (Fig. 19E y G). A pesar de que en los machos existieron las mayores diferencias en cuanto al HVA hipocampal entre tratamientos, no hubo una correlación clara con su desempeño en las pruebas de sociabilidad (Fig. 19F y H).



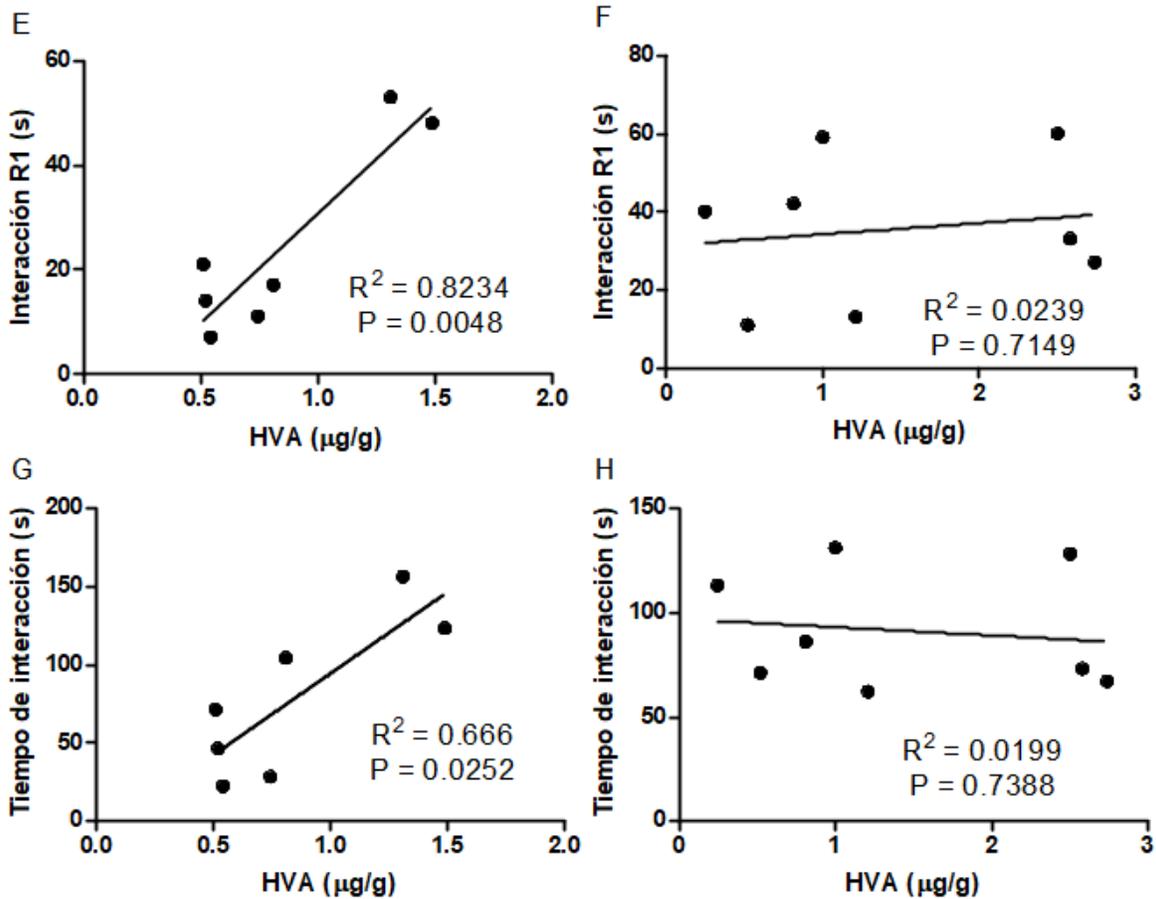


Figura 19. **Correlación dopamina hipocampal-comportamiento:** Relación entre la concentración de HVA en el hipocampo con la exploración de las distintas zonas del campo abierto en hembras (A, C) y machos (B, D). Se muestra también la relación con el tiempo de interacción con un ratón desconocido y el tiempo total de interacción con ambos objetos (jaula ocupada y vacía) para hembras (E, G) y machos (F, H) de ambos tratamientos en la prueba de tres cámaras.

5.3.1.4 Dopamina hipotalámica

Si bien la dopamina no juega un rol protagónico en la función hipotalámica, se consideró interesante determinar si la AIM podría afectar su señalización en este órgano del SNC. En las hembras los resultados entre tratamientos fueron muy similares para todas las moléculas determinadas (Fig. 20A). En los machos se observa un efecto similar, aunque resalta la ausencia en la detección de DOPAC en ratones sometidos a AIM, lo que probablemente indique una rápida eliminación de dopamina, la cual se degrada y se desecha de forma más

veloz tal vez por el aumento en la actividad de la enzima Catecol-orto-metiltransferasa (COMT), enzima encargada de convertir DOPAC en HVA (Fig. 20B).

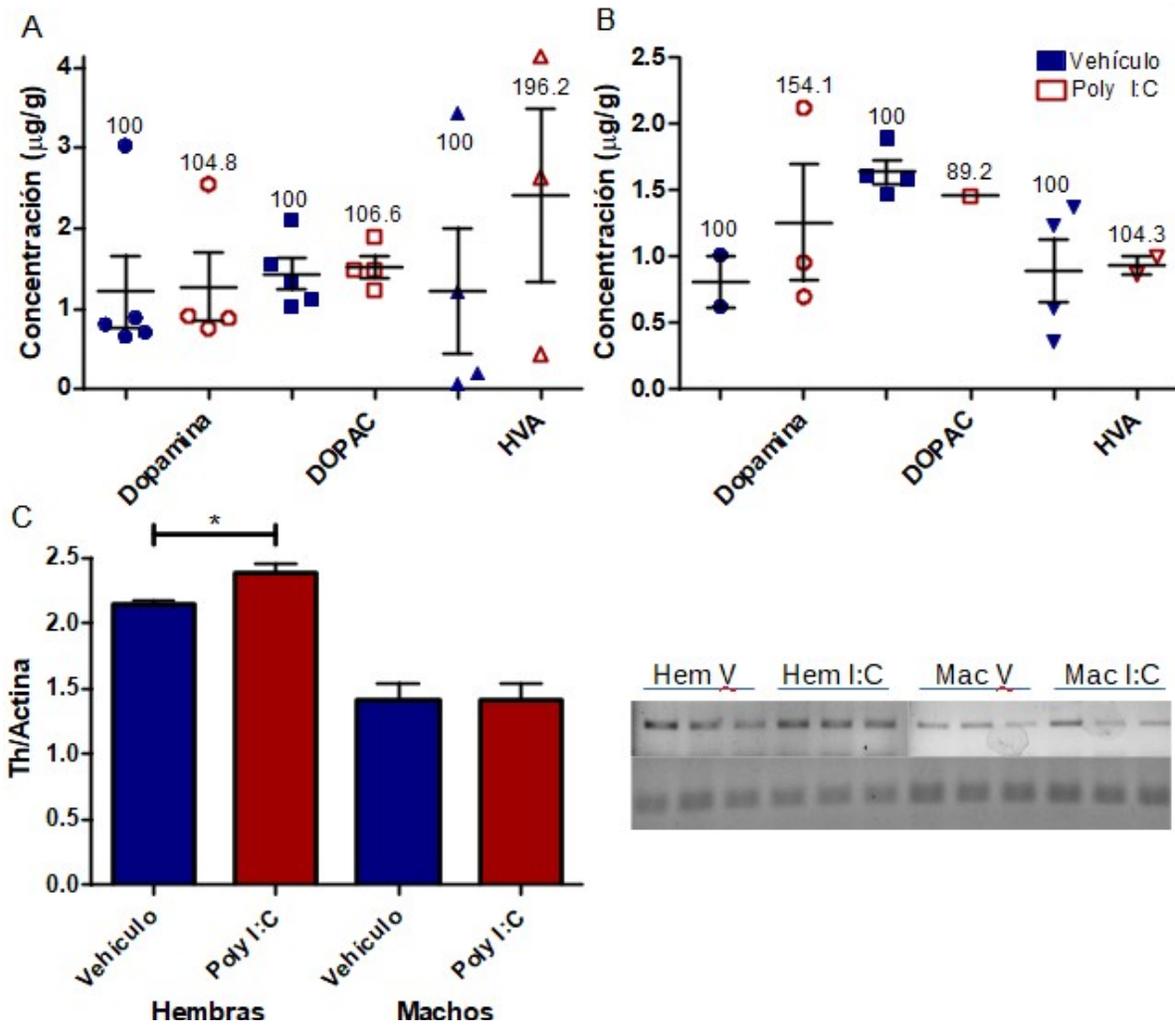


Figura 20. **Dopamina y sus metabolitos en hipotálamo:** Concentración de dopamina, DOPAC y HVA en microgramos por gramo de tejido de hipotálamo de hembras (A) y machos (B). C: Expresión relativa de TH normalizada a la expresión de actina. Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. PCR n=3. Promedio ± EE. A y B: Porcentajes comparados con respecto al control. T-test: *P<0.01.

Curiosamente, en el hipotálamo sí se aprecian diferencias en la expresión de TH, donde bajo el tratamiento con Poly I:C se observa una mayor expresión en el mensajero de esta enzima en el caso de hembras en comparación con las tratadas con vehículo (Fig. 20C).

Dado que la concentración de dopamina hipotalámica es similar en todos los casos, es probable que nuevamente haya más mecanismos que participen en la producción de dopamina además de sólo la expresión del mARN de TH.

Debido a la similitud en el metabolismo de dopamina hipotalámica en ambos tratamientos, no se encontró alguna correlación con el comportamiento de los individuos en las diversas pruebas realizadas. Nuevamente, esto es probable porque la dopamina no juega un papel central en la función del hipotálamo, probablemente sea en la producción y señalización de neuropéptidos donde existan las mayores diferencias.

5.3.2 Señalización noradrenérgica

5.3.2.1 Noradrenalina en hembras

La dopamina además de degradarse en DOPAC y HVA puede ser utilizada para sintetizar noradrenalina (NA) por medio de la dopamina- β -hidroxilasa en neuronas noradrenérgicas. Se decidió determinar la concentración de NA en las mismas cuatro zonas del cerebro: corteza, estriado, hipocampo e hipotálamo, tanto en hembras y como en machos (Fig. 21 y 22). En el estriado de hembras tratadas con Poly I:C se encontró un aumento significativo del 44% en la cantidad de NA con respecto al control (Fig. 21A). En hipocampo e hipotálamo se puede notar una tendencia similar a que este neurotransmisor se encuentre elevado en ratonas sometidas a AIM en comparación con las tratadas con vehículo. En el caso de la corteza los resultados fueron similares entre tratamientos para el caso de hembras. Es probable que la disminución en la cantidad de dopamina estriatal en hembras expuestas a inflamación materna (Fig. 16A) sea debido a que una parte de esta dopamina se esté destinando para la síntesis de noradrenalina.

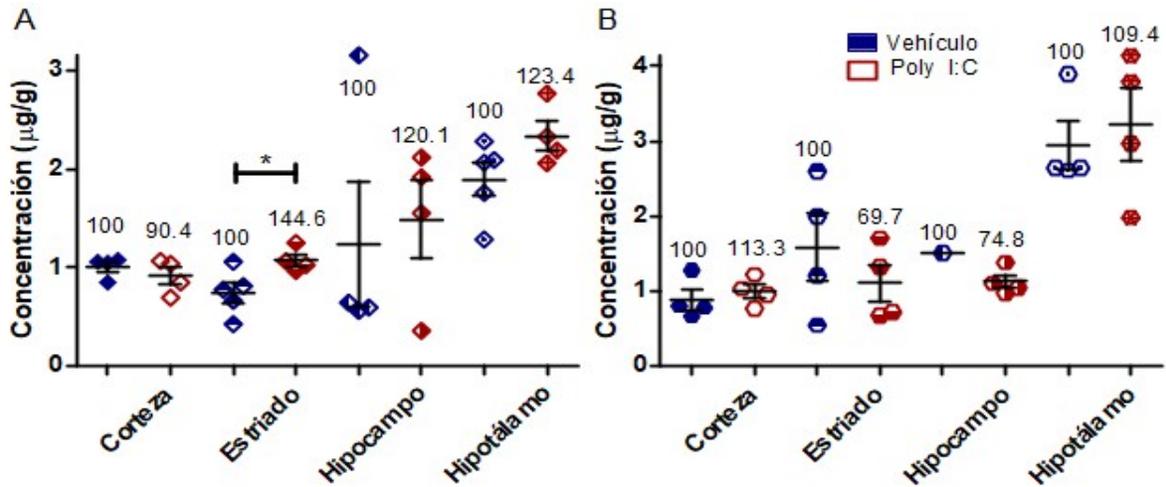


Figura 21. **Noradrenalina en distintas zonas del cerebro:** Concentración de noradrenalina en miligramos por gramo de tejido de cerebro de hembras (A) y machos (B). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. Promedio ± EE. Porcentajes comparados con respecto al control. T-test: *P<0.05

En cuanto al comportamiento, las concentraciones de NA en el estriado mostraron una correlación negativa con respecto al tiempo de interacción durante la prueba de sociabilidad, en donde las hembras tratadas con Poly I:C mostraron la mayor afección con una respuesta antisocial en comparación con las tratadas con vehículo (Fig. 22A).

De forma interesante, también resultó una significativa correlación negativa entre los niveles de NA estriatal con el índice de preferencia a sacarosa (Fig. 22C), en donde a pesar de que no hubo afección aparente en las hembras, parece existir una influencia de este neurotransmisor en la respuesta a un estímulo placentero, si bien no se descarta el hecho de que sea una correlación por coincidencia.

5.3.2.2 Noradrenalina en machos

De manera similar a las hembras, la corteza de los machos tratados con vehículo y Poly I:C mostró niveles similares de NA, al igual que en el hipotálamo. Es de llamar la atención que

en el hipocampo prácticamente no se detectó NA en los ratones control, contrario a los tratados con Poly I:C donde todos mostraron una concentración similar de la misma molécula, probablemente por una mayor presencia de NA a causa del tratamiento materno o simplemente por algún artefacto técnico (Fig. 21B).

En cuanto a la correlación con las pruebas conductuales, aparentemente la NA no juega un papel primordial en la afectación en el comportamiento de los machos provocada por AIM. Contrario a las hembras, no existió relación alguna con las pruebas de sociabilidad, anhedonia e incluso campo abierto (Fig. 22B y D).

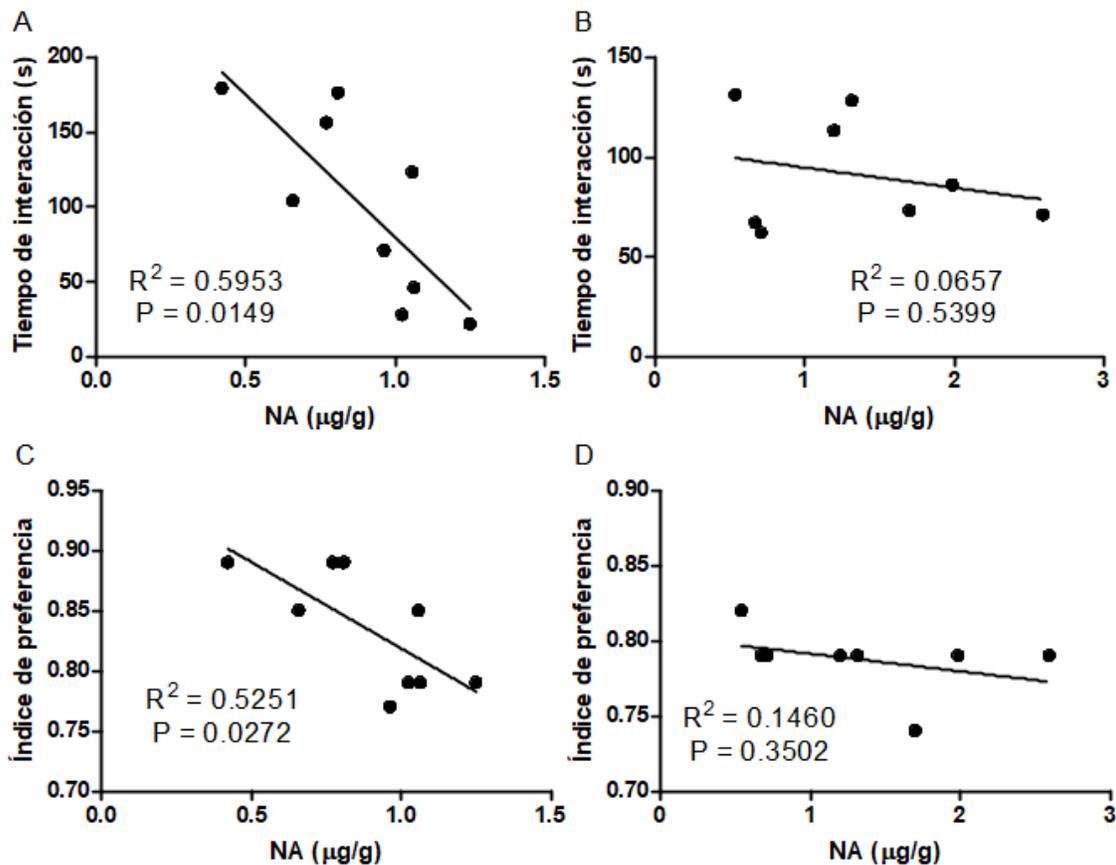


Figura 22. **Correlación noradrenalina estriatal-preferencia:** Relación entre la concentración de noradrenalina en el estriado con el tiempo total de interacción en hembras (A) y machos (B) durante la prueba de tres cámaras. Se muestra también la correlación con el índice de preferencia a sacarosa para hembras (C) y machos (D) de ambos tratamientos en la prueba de anhedonia.

5.3.3 Señalización serotoninérgica

5.3.3.1 Serotonina cortical

En la corteza de ambos sexos se observaron relativamente bajas concentraciones de serotonina y su producto de desecho 5-HIAA, siendo mayor la concentración del primero (Fig. 23A). A pesar de que aparentemente la inflamación materna no tuvo un efecto en la cantidad de serotonina en la corteza, es claro que en los machos hay una tendencia hacia un aumento del 80% en la cantidad de 5-HIAA en esta zona, lo cual, al igual que con la dopamina, indica un rápido metabolismo y degradación de serotonina. La principal enzima para llevar a cabo este proceso es la monoamino oxidasa A (MAOA) (Çakir, 2017).

De manera análoga al análisis de dopamina, se determinó la expresión del mRNA de la enzima limitante en la producción de serotonina cerebral: la Triptófano hidroxilasa 2 (TPH2). Si bien las diferencias no son estadísticamente significativas, se observa una tendencia hacia una disminución en la expresión de este gen en los machos sometidos a inflamación materna en comparación con los controles (Fig. 23C). Adicionalmente, se puede notar una expresión menor de TPH2 cortical en el caso de machos en comparación con las hembras independientemente del tratamiento, lo cual sugiere que el comportamiento y expresión de neurotransmisores es diferente dependiendo del sexo de los animales, debiendo ser considerado en futuros experimentos. De manera similar a la corteza, no se encontraron diferencias notorias en la concentración de serotonina o 5-HIAA en las demás zonas del cerebro analizadas; tampoco se observó una clara correlación entre estas moléculas y las distintas pruebas sociales en respuesta a la activación inmune materna.

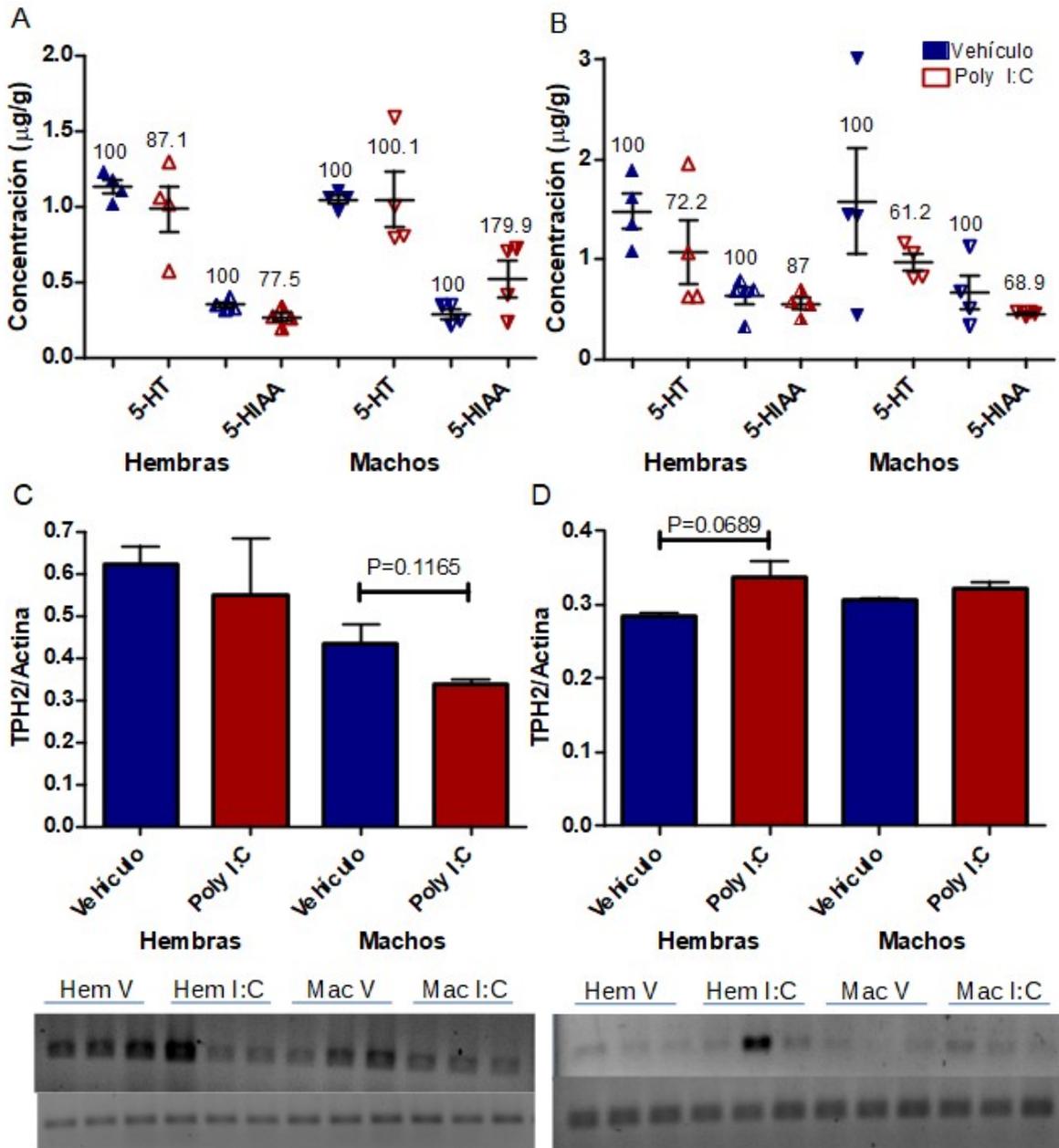


Figura 23. **Serotonina y 5-HIAA en corteza y estriado:** Concentración de serotonina y 5-HIAA en microgramos por gramo de tejido de corteza (A) y estriado (B) de hembras y machos. Expresión relativa de TPH2 normalizada a la expresión de actina en corteza (C) y estriado (D). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. PCR n=3. Promedio ± EE. A y B: Porcentajes comparados con respecto al control. T-test.

5.3.3.2 Serotonina estriatal

De manera interesante, se observó que la administración de Poly I:C en etapa gestacional produjo una fuerte tendencia a disminuir los niveles de serotonina y de 5-HIAA en el estriado de ambos sexos al compararlos con los administrados con vehículo (Fig. 23B). Sin embargo, la diferencia fue más drástica en el estriado de ratones macho: una reducción del 30 al 40% comparada con una disminución del 13-28% para las hembras con respecto a los animales control. Contrario a esto, la expresión relativa de TPH2 parece verse aumentada bajo el paradigma de AIM, en el caso de hembras. Si bien puede parecer un resultado opuesto a la concentración de serotonina determinada por HPLC, hay que recordar que la mayor cantidad de serotonina que señala en el estriado es producida en el cerebro medio, además, mucha de la serotonina producida en esta zona puede señalizar en regiones más alejadas, por lo que es muy probable que no toda la serotonina que se encontró en el estriado de estos ratones haya sido producida ahí mismo.

Estos resultados empatan con las correlaciones de serotonina estriatal y el desempeño en la prueba de campo abierto. Dado que en las hembras no hubo diferencias en el comportamiento y la diferencia en los niveles de serotonina fue menor, no se encontró alguna correlación clara en este par de resultados (Fig. 24A y C). Por otra parte, en los machos, donde la inflamación materna tuvo como consecuencia un recorrido prolongado en la zona segura del campo y un reducido tiempo de exploración en la zona abierta, hubo una correlación opuesta de cada parámetro con la concentración de serotonina estriatal, es decir, a menor concentración de serotonina (el caso del tratamiento con Poly I:C) los individuos pasaron menos tiempo explorando la zona interna y más tiempo explorando la zona externa (Fig. 24B y D).

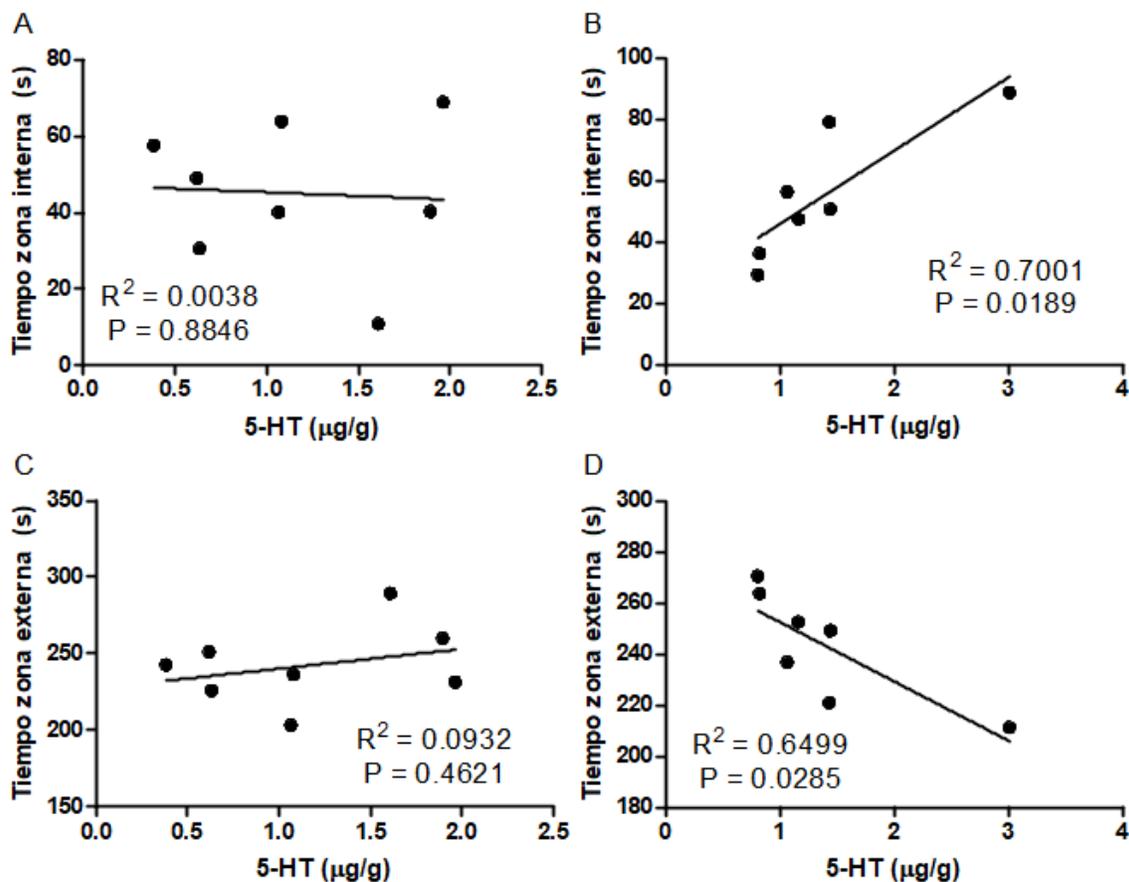


Figura 24. **Correlación serotonina estriatal-ansiedad y exploración:** Relación entre la concentración de serotonina (5-HT) en el estriado con la exploración de las distintas zonas del campo abierto en hembras (A, C) y machos (B, D).

5.3.3.3 Serotonina hipocampal

A pesar de que no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para la serotonina hipocampal, de manera interesante se puede observar que la concentración de 5-HIAA es igual o mayor que la de serotonina, indicando un recambio de serotonina más acelerado en comparación con lo observado en corteza o estriado. Además, los machos sometidos a AIM tienden a presentar concentraciones mayores de ambas moléculas con respecto a las hembras sometidas al mismo tratamiento (Fig. 25A).

En cuanto al comportamiento, la vía serotoninérgica se observó involucrada con la respuesta de los ratones ante estímulos placenteros (Fig. 25B y C). Se observó una correlación negativa entre la concentración de 5-HIAA hipocampal con el índice de preferencia a sacarosa. Aparentemente, mayores niveles de este producto de desecho (5-HIAA) y por tanto, un mayor metabolismo de serotonina, podrían conllevar a una menor preferencia hacia un estímulo placentero en el caso de machos.

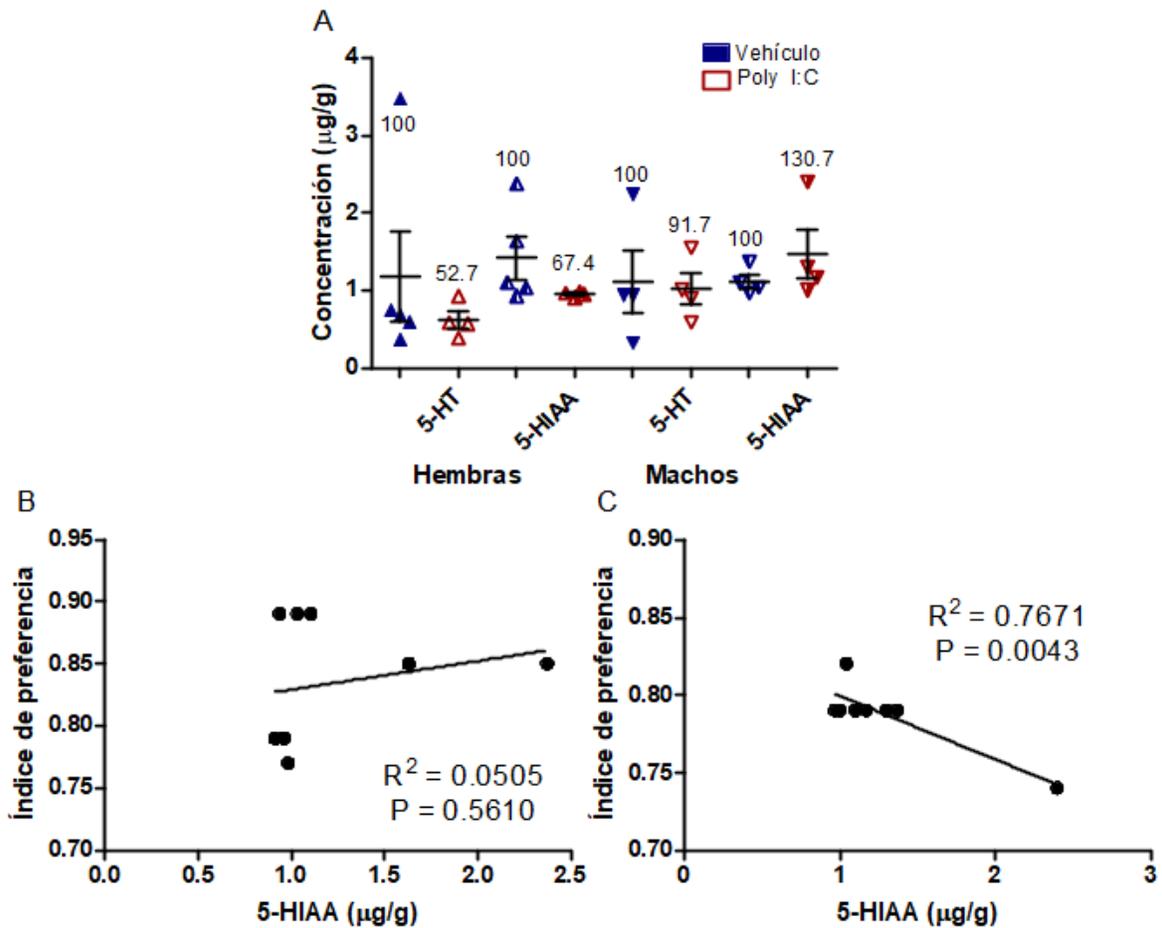


Figura 25. **Serotonina hipocampal y correlación con anhedonia:** A: Concentración de serotonina y 5-HIAA en microgramos por gramo de tejido de hipocampo. Relación entre la concentración de 5-HIAA en el hipocampo con el índice de preferencia a sacarosa en hembras (B) y machos (C). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. Promedio \pm EE. A: Porcentajes comparados con respecto al control, T-test: $P > 0.05$.

5.3.3.4. Serotonina hipotalámica

La mayor velocidad de recambio de serotonina fue observada en el hipotálamo, ya que, tanto en hembras como en machos control, la concentración de serotonina fue menor que la de su producto de desecho, resaltando las diferencias en el metabolismo de los neurotransmisores entre regiones del cerebro (Fig. 26A). En hembras sometidas a AIM se observó una tendencia hacia una elevada concentración de 5-HT con respecto al control en el hipotálamo. En los machos se mostró una tendencia hacia una reducción en la cantidad del producto de desecho de serotonina en comparación con los tratados con vehículo.

La serotonina hipotalámica tuvo relación con el desempeño de los ratones en la prueba de campo abierto de manera contrastante. Aún cuando no existieron diferencias significativas entre tratamientos, se encontró una clara correlación negativa entre los niveles de serotonina y tiempo de exploración en la zona interna de la arena; por el contrario, se observó una correlación positiva entre los niveles de serotonina y el tiempo de exploración de la zona externa en el caso de machos (Fig. 26C y E). A pesar de que en las hembras tampoco hubo una diferencia importante en los niveles de serotonina en respuesta a AIM, sí se observó una leve relación contraria al caso de los machos. Aparentemente, una alta concentración de serotonina indicaría una mayor exploración en la zona interna y una menor en la externa (Fig. 26B y D). En la prueba de campo abierto las hembras no mostraron diferencias en su comportamiento a consecuencia del tratamiento. Por lo tanto, es probable que la serotonina esté involucrada en un circuito que de alguna forma proteja a las hembras mediante un aumento en la señalización serotoninérgica en el hipotálamo al menos (Fig. 26B y D).

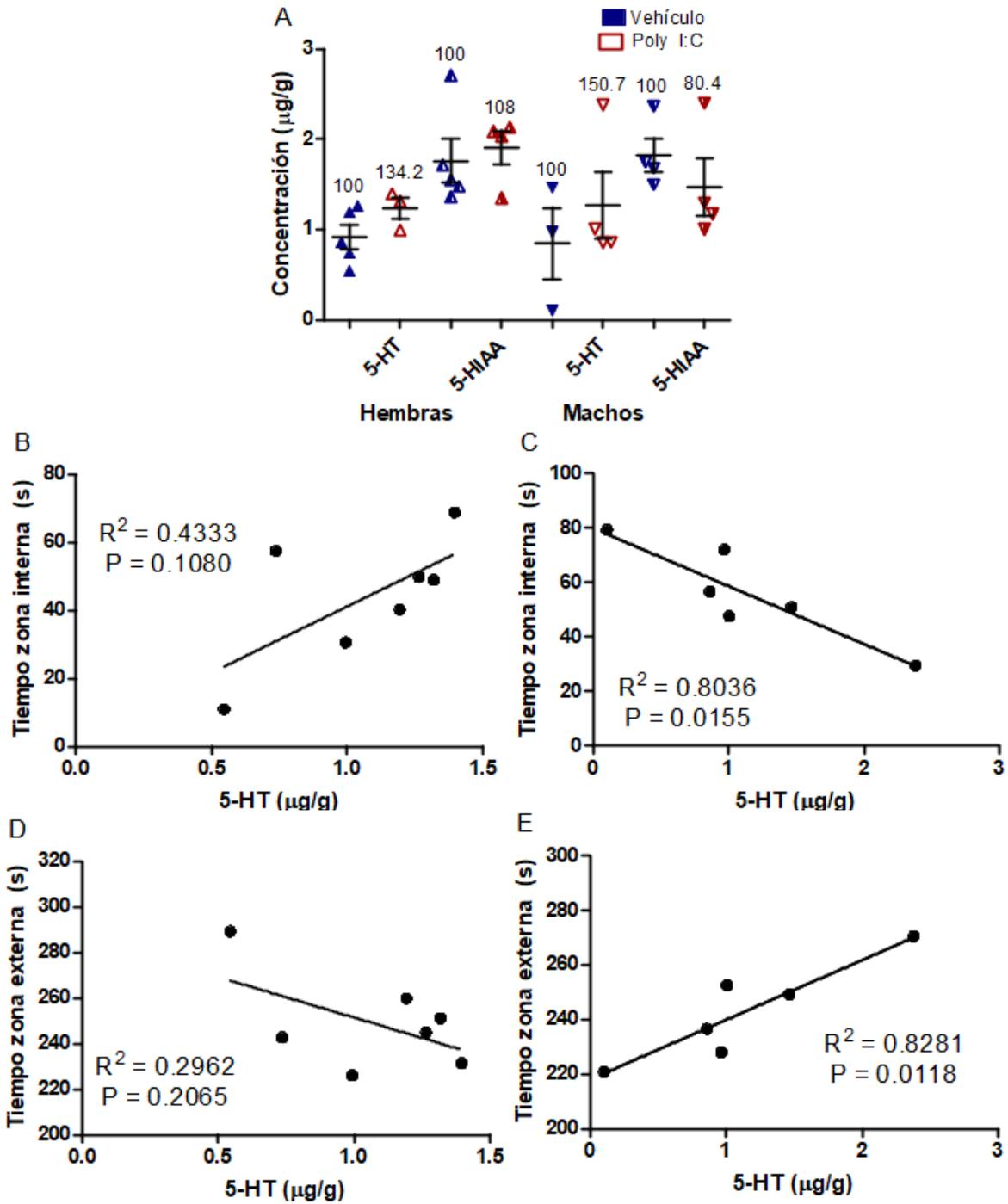


Figura 26. **Serotonina hipotalámica y correlación con ansiedad y exploración:** A: Concentración de serotonina y 5-HIAA en microgramos por gramo de tejido de hipotálamo. Relación entre la concentración de 5-HT en el hipotálamo con la exploración de las distintas zonas del campo abierto en hembras (B, D) y machos (C, E). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. Promedio \pm EE. A: Porcentajes comparados con respecto al control, T-test.

5.3.4 Señalización por aminoácidos

5.3.4.1 Aminoácidos en corteza

Se determinaron las concentraciones de dos aminoácidos excitatorios (aspartato y glutamato), el principal neurotransmisor inhibitorio GABA, y glutamina, un intermediario y precursor en la formación de glutamato y GABA. En la corteza de ratones hembra no existieron diferencias resaltables en cuanto al tratamiento con vehículo o con Poly I:C gestacional (Fig. 27A). Si bien en los machos también se obtuvieron resultados similares, se puede observar una ligera tendencia hacia la disminución de aspartato y glutamato cortical en los animales expuestos a AIM (Fig. 27B).

No se encontraron correlaciones entre la concentración de alguno de los aminoácidos y las distintas pruebas conductuales en ambos sexos. Esto es probablemente consecuencia de la similitud en los resultados de ambos tratamientos y sexos.

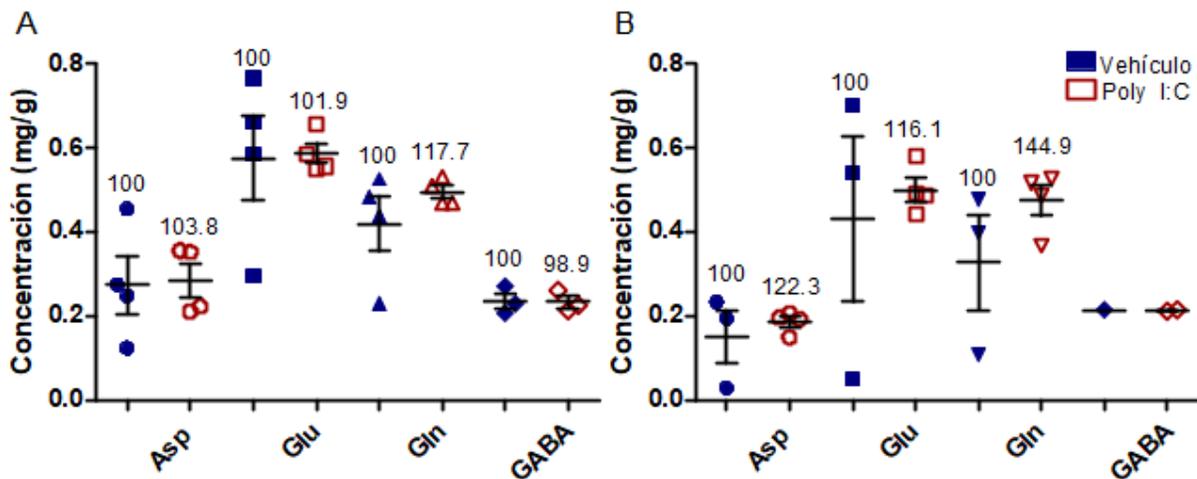


Figura 27. **Aminoácidos en corteza:** Concentración de aspartato, glutamato, glicina y GABA en miligramos por gramo de tejido de corteza en hembras (A) y machos (B). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. Promedio \pm EE. Porcentajes comparados con respecto al control. T-test.

5.3.4.2 Aminoácidos en hipocampo

Además de los aminoácidos mencionados anteriormente, en hipocampo se determinaron también los niveles de taurina, un aminoácido aparentemente inhibitorio involucrado en la modulación de comportamientos tipo ansiedad (Bureau y Olsen, 1991, Kong *et al.*, 2006). Este aminoácido tendió a disminuir en el hipocampo de hembras tratadas con Poly I:C y no mostró ningún cambio en los machos a causa del tratamiento materno (Fig. 28).

A diferencia de la corteza, las concentraciones de glutamato y GABA fueron mucho mayores en esta zona del cerebro al tiempo que aspartato y glutamina mantenían cantidades similares, de hecho, mientras que en corteza la relación GABA/glutamato fue menor a 1, en el hipocampo GABA mantuvo niveles mayores con respecto al glutamato, resaltando el carácter inhibitorio de esta región del cerebro.

En hembras es donde se encontraron las diferencias más notorias, pues en aquellas expuestas a inflamación materna las concentraciones de aspartato y glutamato fueron menores, alrededor del 40% con respecto a los controles (Fig. 28A). Con respecto a los niveles de glutamina y taurina, estos presentaron una reducción del 26%, si bien esta no fue significativa. Dado que los niveles de GABA fueron prácticamente los mismos para ambos tratamientos, se pudo determinar que el efecto de la AIM en el hipocampo se centra a nivel de señales excitatorias y no en inhibitorias, al menos para el sexo femenino.

En los machos el efecto sobre los aminoácidos excitatorios fue similar, aún cuando la disminución de aspartato sólo fue del 22%, en glutamato esta disminución fue de hasta un 36%, esto apoya aún más el impacto de la inflamación materna sobre las señales excitatorias de la descendencia adulta (Fig. 28B). En contraste con las hembras, la concentración de taurina y glutamina fue muy similar en ambos tratamientos, mientras que

no se pudo determinar claramente una diferencia en los niveles de GABA hipocampal, debido a la dispersión de los datos de los animales tratados con Poly I:C, probablemente debido a fallas técnicas en la detección de este aminoácido.

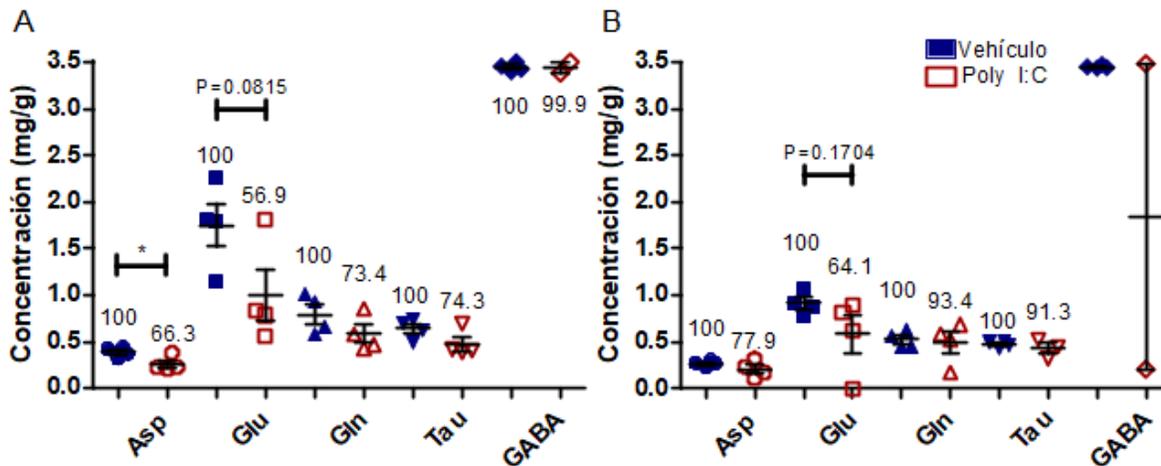


Figura 28. **Aminoácidos en hipocampo:** Concentración de aspartato, glutamato, glicina, taurina y GABA en miligramos por gramo de tejido de hipocampo en hembras (A) y machos (B). Vehículo machos n=5; Vehículo hembras n=4; Poly I:C machos n=4; Poly I:C hembras n=4. Promedio ± EE. Porcentajes comparados con respecto al control. T-test.

Se relacionó la concentración de glutamato con el desempeño de los ratones en la prueba de sociabilidad y se observó una correlación positiva entre los niveles de glutamato con el tiempo de interacción con el ratón desconocido y el tiempo de exploración total durante toda la prueba (Fig. 29). Es en machos donde la correlación fue clara y estadísticamente significativa, aunque en las hembras no se puede apreciar alguna tendencia o correlación clara. A pesar de que no se encontró una relación parecida en cuanto al aspartato hipocampal, es probable que el efecto sea similar debido a que ambos cumplen con funciones relacionadas dentro del SNC, si bien cabe aclarar que la señalización por glutamato es por mucho la dominante independientemente de la zona cerebral que se esté analizando (Herring *et al.*, 2015).

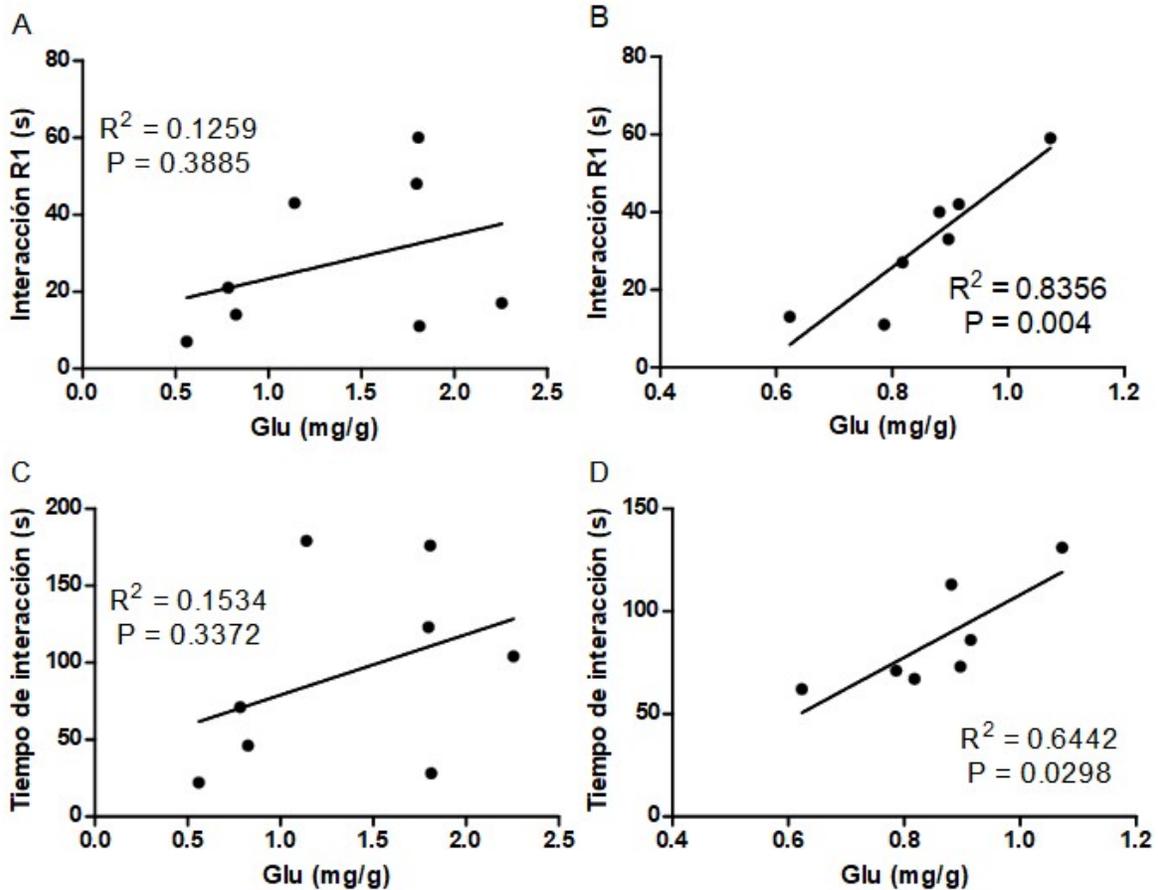


Figura 29. **Correlación de aminoácidos hipocámpales-sociabilidad:** Relación de la concentración de glutamato hipocámpal con el tiempo de interacción con un ratón desconocido y el tiempo total de interacción con ambos objetos (jaula ocupada y vacía) para hembras (A, C) y machos (B, D) de ambos tratamientos en la prueba de tres cámaras.

5.4 Perfil inflamatorio

5.4.1 Inflamación periférica

Finalmente, se determinaron las concentraciones de tres de las principales citocinas pro-inflamatorias cuya elevada concentración en diversas situaciones (sobre todo durante una infección) suele indicar un estado pro-inflamatorio sistémico cuando son determinadas en suero sanguíneo: interleucina 1β (IL- 1β), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF), todas ellas por el método de ELISA.

Para evaluar el estado inflamatorio general se midieron las concentraciones de estas citocinas en el suero sanguíneo de hembras y machos adultos tratados con vehículo o Poly I:C. Como se puede observar en la figura 30, ninguna citocina se mostró elevada a causa del tratamiento con Poly I:C gestacional, incluso, los niveles de TNF en hembras y de IL-6 en machos tienden a disminuir en los animales sometidos a AIM (Fig. 30 A y C). Para IL-1 β el resultado fue similar entre sexos y tratamiento (Fig. 30B), sin embargo, es de destacar que independientemente de la condición gestacional, la concentración de estas citocinas varía entre sexos al igual que los neurotransmisores y sus enzimas limitantes. Un ejemplo muy claro es el caso de TNF, cuya expresión es mayor en hembras control. Por otro lado, IL-1 β mostró una concentración mayor en machos, independientemente del tratamiento.

Curiosamente IL-6 se muestra disminuida en machos tratados con Poly I:C gestacional en la progeñe adulta en comparación con los tratados con vehículo. De manera interesante, la mayor concentración de IL-6 en sangre correspondió al mayor tiempo de interacción con un ratón desconocido en la prueba de sociabilidad también en machos (Fig. 31D), esto demuestra que así como la sobre producción de esta citocina puede ser detrimental para el organismo, su déficit también puede estar relacionado con comportamientos antisociales como consecuencia de una inflamación materna durante el desarrollo. Esta situación no se cumplió para el caso de hembras.

5.4.2 Inflamación central

Dado que no se observaron grandes cambios en el perfil inflamatorio sistémico, se decidió evaluar solamente un marcador general de inflamación en el SNC. Para este fin se determinó la concentración de TNF en la corteza de los ratones por el método de ELISA.

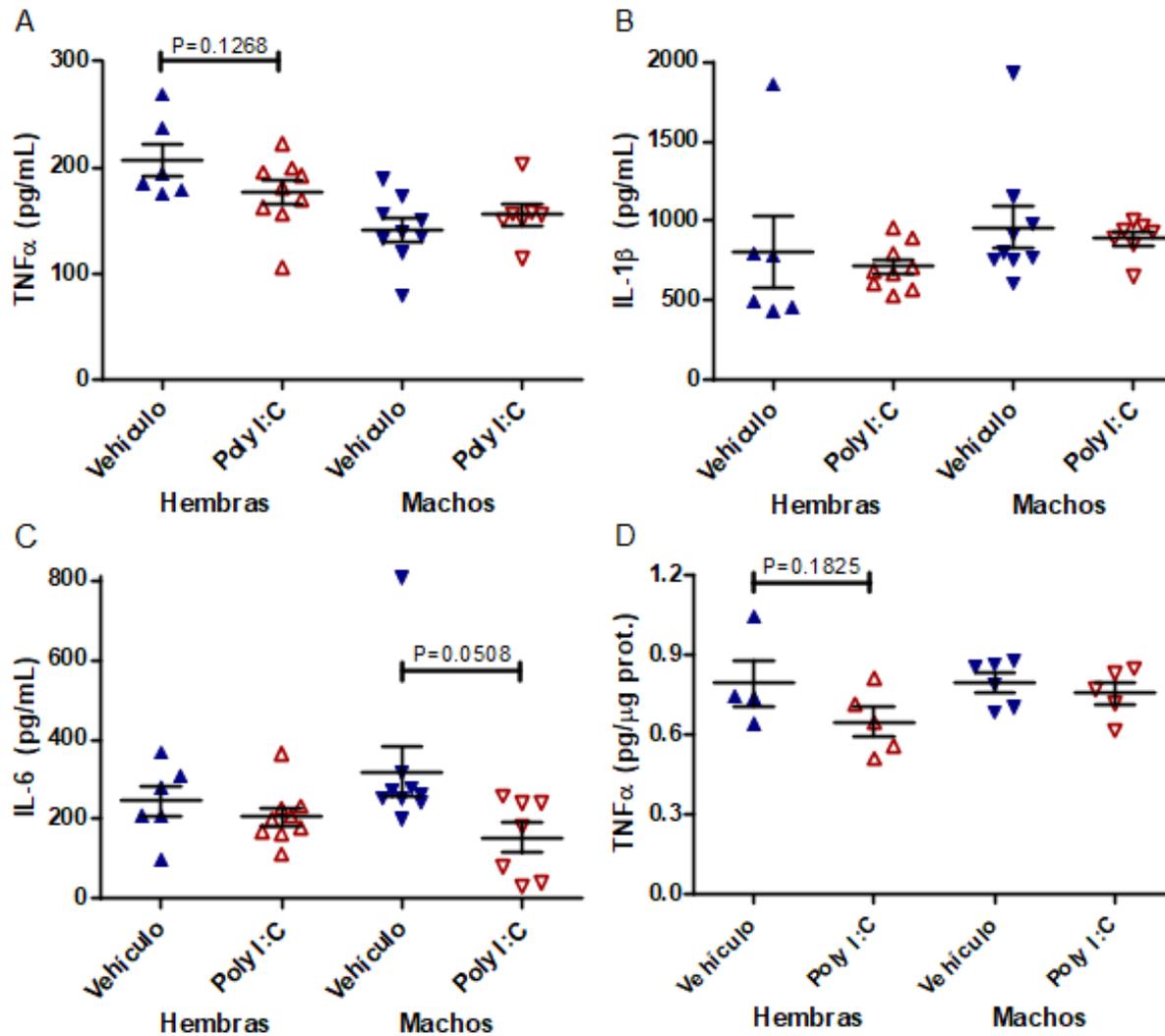


Figura 30. **Perfil inflamatorio sistémico y cerebral:** Concentración de TNF α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) en picogramos de proteína por mililitro de suero sanguíneo de la descendencia. D: Concentración de TNF en picogramos por microgramo de proteína extraída en corteza de la descendencia. Vehículo machos n=8-6; Vehículo hembras n=6-4; Poly I:C machos n=7-5; Poly I:C hembras n=9-5. Promedio \pm EE. T-test.

Al igual que en la periferia, en los machos la expresión de esta citocina fue muy similar y, de manera interesante, no hubo una variación notable con respecto a las hembras sin importar el tratamiento, a diferencia de lo observado en la periferia, de hecho, tampoco hubo diferencias en la concentración de TNF entre tratamientos en hembras (Fig 30D). Sin embargo, cabe resaltar que al igual que con los niveles de IL-6 en suero, la concentración

de TNF a nivel central correlaciona fuertemente de manera positiva con el tiempo de interacción social en los ratones macho (Fig. 30B). A pesar de que en las hembras hubo resultados similares entre tratamientos, es únicamente en los machos donde se observa esta correlación, la cual habla de un papel benéfico en estas citocinas cuando sus concentraciones son las adecuadas.

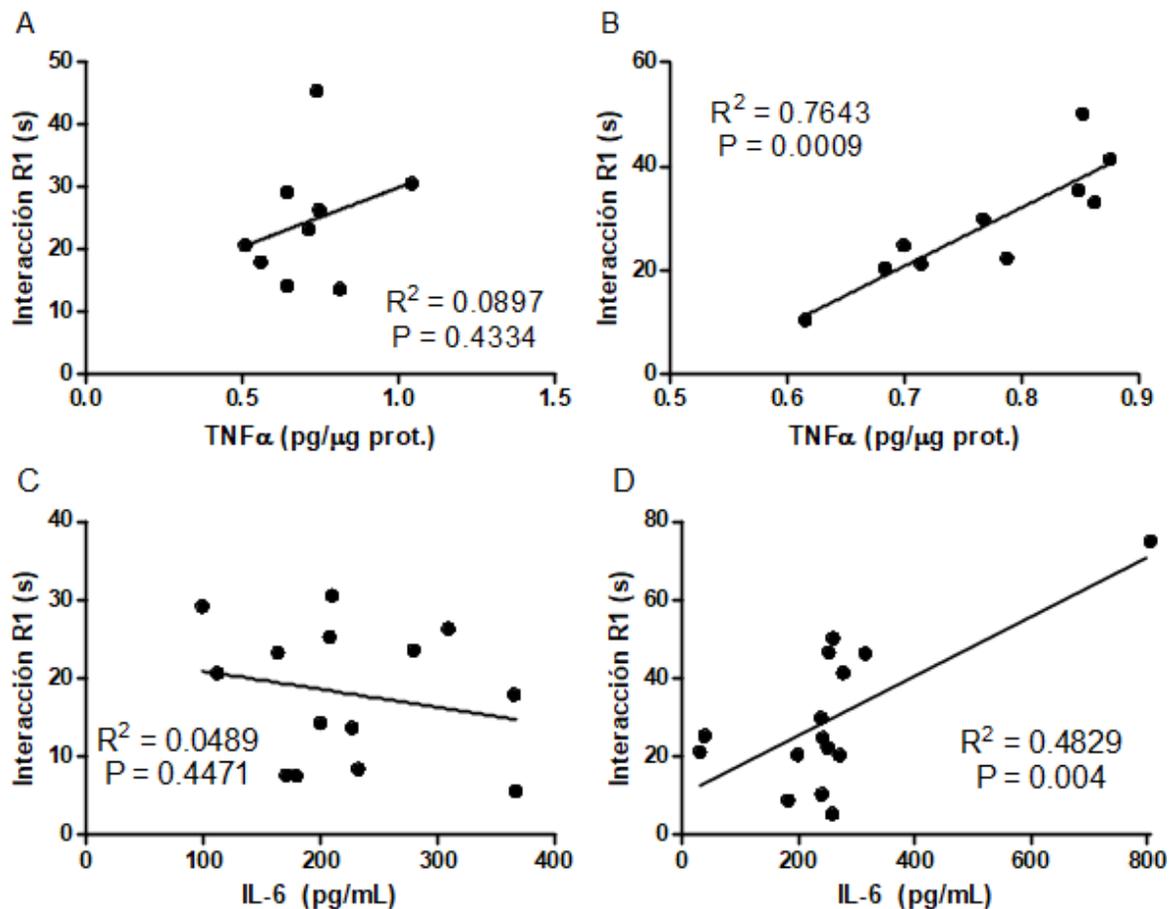


Figura 31. **Correlación entre citocinas pro-inflamatorias y sociabilidad:** Relación de la interacción con un ratón desconocido en la prueba de tres cámaras con la concentración de TNF en corteza (A y B) e IL-6 en suero (C y D), en hembras (A y C) y machos (B y D) de ambos tratamientos.

Finalmente, la Tabla 1 resume la relación que hubo entre los distintos comportamientos evaluados durante las pruebas conductuales y las diferencias en las concentraciones de los neurotransmisores determinados con respecto al tratamiento,

distinguiendo entre zonas cerebrales y sexo de los animales. Se resalta lo mencionado anteriormente: hembras y machos mostraron diferentes afecciones en cuanto al comportamiento a causa de la AIM, incluso, los neurotransmisores implicados y las áreas afectadas no siempre fueron las mismas, si bien en general la vía más involucrada fue la dopaminérgica. Este enfoque nos permite estudiar de manera más precisa y específica el origen y la neuroquímica de los trastornos mentales asociados a un fenómeno de inflamación materna y comportamientos tipo esquizofrenia y/o autismo.

Tabla 1. Los recuadros rojos indican correlaciones positivas y los azules negativas entre la concentración del neurotransmisor indicado y el comportamiento señalado, las flechas señalan el aumento o disminución a causa del tratamiento con Poly I:C al ser comparado con los controles. * Tendencia, diferencia no significativa. ** Sin tendencia.

Hembras		Machos	
Comportamiento antisocial		Ansiedad-capacidad exploratoria	
Corteza	▼ HVA = DA ▲	Hipocampo	▲ HVA = DA ▼
Hipocampo	▼ HVA* = DA ▲	Estriado	5-HT* ▼
	Glu, Asp ▼		
Estriado	NA ▲	Hipotálamo	5-HT* ▲
Anhedonia		Comportamiento antisocial	
Corteza	▼ HVA = DA ▲	Corteza	▼ HVA = DA ▲
Estriado	▼ DA	Hipocampo	Glu* ▼
	NA ▲		
Ansiedad		Anhedonia	
Hipotálamo	5-HT* ▲	Corteza	DA**
		Estriado	DA* ▲

VI. DISCUSIÓN

El estado de salud mental está determinado por múltiples factores: sociales, ambientales, biológicos y psicológicos; un adecuado estado de salud mental en la población requiere de acciones de salud pública. En este sentido, los impactos que la falta de visión integral del ser humano han producido en las estrategias y políticas de acción, se pueden observar en la incidencia de trastornos mentales, y también, en el grado de conocimiento y estudio que se tiene en el entorno social y económico del país (Becerra-Partida, 2014).

Desde el ámbito de la investigación, en los últimos años se ha establecido que una inflamación sistémica exacerbada durante el embarazo puede ser un importante factor de riesgo para que la descendencia desarrolle algún trastorno mental como esquizofrenia, autismo, depresión mayor o trastorno bipolar en la vida adulta (Brown y Derkits, 2010; Lee *et al.*, 2015; Mazina *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016; al-Haddad *et al.*, 2019). Para entender el mecanismo mediante el cual la AIM irrumpe el correcto desarrollo del SNC causando comportamientos alterados en la descendencia, diversos grupos de investigación han utilizado el modelo de inyección de Poly I:C en roedores gestantes para reproducir los efectos que tendría una infección viral durante el embarazo medio, principalmente (Hsiao y Patterson, 2012; Malkova *et al.* 2012; Meyer, 2014; Wu *et al.*, 2017).

El presente trabajo tuvo como objetivo elucidar los efectos de la AIM sobre la producción de diversos neurotransmisores que participan en conductas humanas que normalmente se ven alteradas en padecimientos como esquizofrenia o autismo, así como su relación directa con dichos comportamientos distinguiendo entre machos y hembras y evaluando algunos elementos del perfil inflamatorio periférico y central de ambos sexos.

Prácticamente todos los estudios sobre AIM con el modelo de Poly I:C se han centrado en los cambios producidos dentro del SNC (Meyer, 2014, Knuesel *et al.*, 2014). A pesar de esto, es muy probable que existan afecciones periféricas en distintos órganos que pueden o no relacionarse con las alteraciones en el comportamiento. En este sentido, no observamos cambios en el peso de la descendencia bajo ninguno de los tratamientos empleados en este estudio (Fig. 8C), sin embargo, al observar la ganancia de peso a través de su crecimiento, fue muy notable que las hembras tratadas con Poly I:C mostraron un aumento en la ganancia de peso de casi el doble en comparación con los controles, sobre todo en las primeras semanas de vida (Fig. 8A). Además, en los machos se observó la misma tendencia, lo que puede ser un indicio de posibles alteraciones metabólicas que aún no han sido determinadas y que pueden ser consecuencia de diversos factores como fallas en el metabolismo a nivel de órganos periféricos, a nivel central, en el hipotálamo, e incluso en un probable comportamiento compulsivo en el que la descendencia consuma más alimento del que hicieron los individuos control. Se sabe que factores como la dieta materna pueden influir en el desarrollo de enfermedades como diabetes tipo 2 en la descendencia con efectos que pueden perdurar hasta dos generaciones (Wei *et al.*, 2015), e incluso se ha relacionado a la microbiota y la dieta materna con la probabilidad de desarrollar autismo en las crías una vez que llegan a la etapa adulta (Buffington *et al.*, 2016), por lo que no sería sorprendente observar este tipo de cambios bajo el paradigma de infección viral materna.

En cuanto al comportamiento, desde un principio se planteó la idea de trabajar con hembras y machos, incluso al analizar los datos de comportamiento eran claras las diferencias en las alteraciones inducidas por la inflamación materna. En la prueba de

anhedonia, los machos fueron los únicos que presentaron disminución en el consumo de sacarosa (Fig. 9), un estímulo normalmente placentero dado el sabor dulce del líquido. Esto es interesante, ya que al relacionarlo con la concentración de DA cortical, hubo una correlación negativa en cuanto al consumo de sacarosa y el contenido de DA en el caso de machos, en las hembras se dio la misma correlación pero con el índice de preferencia a sacarosa (Fig. 15). Además de la corteza, bajas concentraciones de DA estriatal también estuvieron relacionadas con una menor preferencia a sacarosa, al igual que un producto de desecho (DOPAC, en este caso) con el consumo de sacarosa (Fig. 17), de hecho, es en el estriado donde hay menor cantidad de dopamina para el caso de hembras tratadas con Poly I:C con respecto a los controles, donde probablemente la señalización en los circuitos mesocorticales (vía mesocorticolímbica) esté afectando la respuesta de los ratones hacia un estímulo normalmente placentero. En los machos tratados con Poly I:C se observó una tendencia hacia un incremento en la cantidad de DA (Fig. 16), sin embargo, al haber también un incremento de casi el 50% en los niveles de HVA, es probable que el recambio dopaminérgico se mantuviera al mismo ritmo que en los individuos control.

La dopamina participa en los circuitos de recompensa y placer en el cerebro produciendo sensación de gozo y refuerzo para motivar al individuo a realizar ciertas actividades (Çakir, 2017), se relaciona con adicción a sustancias como cocaína y nicotina donde las vías dopaminérgicas suelen verse afectadas por estas drogas (Qi et al., 2008). El déficit dopaminérgico causado por AIM en nuestros ratones también se ve reflejado en el aumento en la concentración de sus metabolitos de desecho, el caso más claro es el del HVA hipocampal en machos (Fig. 18), el producto final en la degradación de DA en el cerebro, el cual también aumenta en el cerebro de pacientes con esquizofrenia y riesgo de

psicosis (Howes et al., 2017). Si bien la excesiva producción de DA se ha asociado a los síntomas positivos de la esquizofrenia (como psicosis), su deficiencia también podría asociarse a los síntomas negativos dependiendo del área del cerebro afectada, resaltando que la anhedonia es uno de esos síntomas (Meyer, 2013). Si bien no podemos decir que nuestros ratones presentan anhedonia estricta, es claro que su preferencia hacia la sacarosa es menor en comparación con los controles, lo que puede deberse a un déficit en el circuito de recompensa del cerebro causado por los bajos niveles de dopamina en algunas regiones como el estriado, así como el probable aumento en su degradación observado en las elevadas concentraciones de HVA en otras como el hipocampo.

Una de las mayores afecciones de la AIM sobre el comportamiento de la descendencia adulta es la sociabilidad (Smith *et al.*, 2006). Los roedores son mamíferos sociales que suelen comunicarse e interactuar constantemente entre ellos, por lo que es de esperarse que en pruebas como el test de tres cámaras, el individuo libre prefiera interactuar con aquel que se encuentra dentro de una jaula que con otra jaula vacía, tal como sucede con los ratones tratados con vehículo de ambos sexos. En el caso del Poly I:C, la descendencia de ambos sexos muestra un notable menor interés al momento de interactuar con su conespecífico, incluso, cuando se le da la opción de interactuar entre un ratón conocido y otro desconocido, su tiempo de interacción total es significativamente menor en comparación con los controles. Este tipo de comportamiento antisocial es característico de personas que padecen autismo y de modelos murinos para el estudio de comportamientos autistas (Crawley, 2007; Silverman et al., 2010). Si bien por la complejidad que representa esta enfermedad en los humanos es difícil decir que un ratón es autista, existe un claro comportamiento de retracción social en nuestros individuos sometidos a AIM.

Además de degradarse en HVA, la dopamina también puede utilizarse para sintetizar noradrenalina por medio de la enzima DBH (dopamina beta hidroxilasa) en neuronas noradrenérgicas. En las hembras de la descendencia expuesta a AIM encontramos niveles elevados de NA en el estriado y una correlación negativa con el tiempo total de exploración en la prueba de tres cámaras (Fig. 20 y 21). Recientemente, se ha sugerido un papel para la NA en la etiología de enfermedades como esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar, donde se ha observado un aumento en la actividad de este neurotransmisor en pacientes con estas enfermedades (Fitzgerald, 2014). Está establecido que la NA se libera cuando existe estrés en humanos y roedores (Hajos-Korcsok et al., 2003), por lo que es probable que el tratamiento con Poly I:C lleve a una alteración tal, que la excesiva producción de esta catecolamina conduzca a un estado de estrés que afecte la capacidad exploratoria y, en el caso de las pruebas de sociabilidad, el interés en la interacción no sólo con un conoespecífico sino también con algún objeto novedoso. En condiciones óptimas, la red neuronal de la corteza prefrontal se mantiene activa gracias a la señalización excitatoria de los receptores NMDA y es modulada por la inhibición proveniente de células GABAérgicas, así como por la participación de receptores de dopamina (D1) y de noradrenalina (alfa-2A) (Arnsten, 2011). En pacientes con esquizofrenia, además de la disfunción general en la actividad de los receptores de dopamina y glutamato, se ha observado hipersensibilidad en receptores adrenérgicos (sobre todo los tipo alfa) que puede conducir a una alterada señalización en la corteza prefrontal por medio de alta señalización de canales HCN-cAMP, todo esto a causa de una exacerbada liberación de noradrenalina tras una exposición a estrés psicológico, lo cual, se propone que a largo plazo puede causar reducción en tamaño y número de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la

corteza, teniendo como consecuencia déficits cognitivos en estos pacientes, además de potenciar los síntomas positivos de la enfermedad (Robbins, 2005; Arnsten, 2011; Kopp *et al.*, 2013; Fitzgerald, 2014). En este estudio no se indujo ningún tipo de estrés antes, durante o después de las pruebas, pero es probable que esta condición de alta noradrenalina predisponga a los ratones afectados por AIM a presentar una respuesta elevada y de mayor duración al estrés, sobre todo al estrés psicológico (como restricción de movimiento, inducción de choques eléctricos, separación materna, etc), tal como ocurre en personas con ciertas afecciones psiquiátricas (Fitzgerald, 2014).

Uno de los neurotransmisores evaluados con un papel importante en aspectos de interacción social es la serotonina. Es un caso interesante, ya que no existieron diferencias significativas entre nuestros tratamientos, solo algunas tendencias. Sin embargo, se ha documentado que la serotonina tiene un papel clave en enfermedades como autismo, donde va de la mano con un déficit en la señalización de oxitocina relacionado principalmente con los comportamientos antisociales (Dölen, 2015). En la periferia de pacientes autistas se ha reportado un aumento en la concentración de serotonina, si bien nosotros sólo la determinamos de manera central, también se ha detectado déficit en su señalización y producción en el SNC de pacientes autistas (Muller *et al.*, 2016). No descartamos que haya una alteración en la señalización de serotonina en nuestros ratones sometidos a AIM, si bien a niveles basales no hay diferencia, es probable que al evaluarlos inmediatamente después de alguna prueba conductual (como el test de tres cámaras) o tras la inducción de un estrés psicológico, físico o fisiológico se logren observar diferencias claras entre tratamientos.

Una prueba clásica para determinar afecciones motoras y comportamientos ansiosos en un mismo test es la prueba de campo abierto. En él, se puede determinar que los

comportamientos mostrados por los ratones en pruebas que requieren que se desplacen de un lado a otro (como el test de tres cámaras) no son resultado de algún impedimento motor. Dado que no hubo diferencias en los parámetros de distancia recorrida y velocidad promedio, podemos aseverar que la locomoción de todos los ratones no está afectada por el tratamiento, tanto para machos como para hembras (Fig. 11 A y B).

De manera natural, los mamíferos pequeños suelen evitar los espacios abiertos e iluminados, sin embargo, también tienden a mantener un perfil exploratorio constante. En pruebas como el campo abierto donde el área es lo suficientemente grande para inducir al individuo a explorar sin sentirse totalmente inseguro, se puede determinar un grado de ansiedad excesiva en roedores cuando estos evitan explorar las áreas abiertas (Seibenhener y Wooten, 2015). A diferencia de las pruebas de sociabilidad, en este caso se encontró relación entre la concentración de serotonina con la exploración en la prueba de campo abierto, donde el aumento de este neurotransmisor a nivel hipotalámico (donde puede haber más relación con la liberación de oxitocina) inhibe la capacidad exploratoria y exagera un fenotipo ansioso (Fig. 26). En el caso del estriado, donde participaría junto con la dopamina en los circuitos de recompensa, el efecto es contrario, el tratamiento con Poly I:C desemboca en una tendencia a presentar menores niveles de serotonina en esta zona del cerebro, conduciendo a una menor motivación en los ratones por explorar la zona central (como se explicó para el caso de dopamina) y manteniéndolos más tiempo en la periferia del campo donde el animal se siente más seguro (Fig. 24). Este último punto puede estar relacionado con la probable predisposición de los ratones tratados con Poly I:C a responder de manera exacerbada al estrés. Aún cuando la prueba de campo abierto no está diseñada para inducir estrés alguno, es probable que en individuos ansiosos (como los tratados con

Poly I:C) sí se presente un estado de alto estrés durante la prueba, todo esto asociado con la alta noradrenalina encontrada en el estriado.

Además de las hipótesis que involucran a las catecolaminas en enfermedades psicóticas, también se ha reconocido que la alteración en la señalización de DA se relaciona directamente con una hipofunción glutamatérgica, esto debido a que la activación de los receptores de DA tipo 2 (DRD2) causan una disminución en la liberación de glutamato, sobre todo en el cerebro medio (Howes et al., 2017). Si bien no es significativo, existe una muy fuerte tendencia a que los ratones tratados con Poly I:C presenten menor concentración de glutamato hipocampal, sobretodo en hembras (Fig. 28), esto correlaciona fuertemente con el desempeño de estos ratones en la prueba de sociabilidad, donde bajas concentraciones de glutamato se relacionan con una menor interacción tanto con un ratón desconocido como con un objeto novedoso (Fig. 29). Previamente se ha establecido que en el circuito mesocortical la actividad de los receptores dopaminérgicos tanto DR1 como DR2 en la corteza prefrontal controla la liberación de glutamato en zonas del cerebro medio como el área ventral tegmental (VTA) a través de controlar la actividad de interneuronas GABAérgicas, resultando en una liberación menor de DA por parte del núcleo accumbens (NAc) hacia la corteza, recalando que este circuito puede ir en sentido inverso (Harte y O'Connor, 2004; Zuckerman y Weiner, 2005; Dölen, 2015; Howes *et al.*, 2017).

Es probable que la alteración en la producción y metabolismo de los neurotransmisores evaluados se deba a una diferencia en la actividad de las enzimas encargadas de su síntesis, transporte y degradación, inclusive, ya se ha observado anteriormente un aumento en la actividad de enzimas como TH tanto en pacientes autistas como en modelos de AIM con Poly I:C (Toru *et al.*, 1988, Meyer *et al.*, 2008). Por esta

razón se evaluó la expresión de los genes de las enzimas limitantes en la producción de dopamina y serotonina: TH y TPH2, respectivamente, como una primera aproximación para explicar las diferencias en las concentraciones de estas catecolaminas. En el caso de dopamina, solo se observó un incremento en la expresión de TH en el hipotálamo (Fig. 20), región donde las concentraciones de dopamina fueron similares entre tratamientos. Sin embargo, es importante señalar la diferencia en la expresión de este gen entre hembras y machos. En estriado, por ejemplo, existe una mayor expresión de TH en hembras independientemente del tratamiento (Fig. 16), por lo que es probable que la neuroquímica cerebral sea lo suficientemente distinta entre sexos como para afectarse de forma desigual por causas de inflamación gestacional y, por tanto, reflejar alteraciones en el comportamiento de manera sexo-dependiente. La misma observación se da para el caso de TPH2, donde la corteza de machos presenta menor expresión de este gen aún en los individuos tratados con vehículo (Fig. 23). En el estriado, el Poly I:C causa una tendencia a disminuir la cantidad de serotonina estriatal en hembras aún cuando la expresión de TPH2 es mayor (Fig. 23). Ya se había mencionado anteriormente que este efecto puede ser a causa de que la serotonina liberada en el estriado no necesariamente se sintetiza ahí mismo, de hecho, la mayor expresión de TPH2 y síntesis de serotonina en el SNC se da a nivel de cerebro medio, en el núcleo dorsal de Rafe (dRPh) (Muller *et al.*, 2016). Además, hay participación de transportadores y enzimas degradadoras, por mencionar algunas, que también influyen en la biodisponibilidad de los neurotransmisores y que no fueron determinadas en el presente estudio. Adicionalmente, es importante resaltar que no se determinó la cantidad de proteína de estas enzimas ni su actividad, por lo que son parámetros que sería interesante evaluar en estudios posteriores.

Es probable que el déficit en la señalización también se deba a alteraciones anatómicas en la estructura de los circuitos cerebrales, de hecho, estudios previos ya han encontrado pequeñas alteraciones estructurales en el paradigma de AIM por Poly I:C que dependen en gran parte de la etapa gestacional en la que se da el insulto (Meyer *et al.*, 2006). Sin embargo, la expresión diferencial de proteínas estructurales de las sinapsis también puede contribuir a que haya una señalización alterada sin mostrar un claro daño estructural. La alteración en el patrón epigenético de los promotores de genes involucrados en la estructura y señalización neuronal es una de las hipótesis más fuertes que pretenden explicar cómo es que el daño inflamatorio causado en un momento puntual del desarrollo puede perpetuarse a través de la vida adulta, cuando ya no está presente (Ovenden *et al.*, 2018). Diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de explorar el metiloma de pacientes con esquizofrenia y autismo en los que se ha observado metilación diferencial en genes involucrados en las vías dopaminérgica, GABAérgica, serotoninérgica y de oxitocina (Abdolmaleky *et al.*, 2006; Gregory *et al.*, 2009; Akbarian, 2014; Wockner *et al.*, 2014; Forsberg *et al.*, 2018; Ovenden *et al.*, 2018). En el caso de la vía dopaminérgica, se ha descrito ampliamente un aumento en la metilación del gen *DRD2*; *Reln*, *Gad1* y *Bdnf* para la vía GABAérgica; *HTR1A* y *HTR2A* para la vía de 5-HT y *OxtR* para el caso de oxitocina (Gregory *et al.*, 2009; Ovenden *et al.*, 2018; Forsberg *et al.*, 2018). De manera importante también se ha encontrado incremento en la expresión de ADN metiltransferasas (DNMT), particularmente de *DNMT1* y *DNMT3a*, lo que podría correlacionar con el aumento en la metilación de algunos de los genes previamente descritos al presentarse una actividad acelerada en las enzimas que se encargan de metilar el ADN (Ovenden *et al.*, 2018). Así mismo, se han identificado genes involucrados en el neurodesarrollo cuya

expresión está alterada en modelos de inflamación materna, lo cual correlaciona con cambios en su patrón de metilación en pacientes humanos (Huang y Akbarian, 2007). Este es el caso de Reelin (Reln, componente de la vía GABAérgica), una proteína involucrada en la correcta migración neuronal y SOX10, un factor de transcripción implicado en el desarrollo de la cresta neural y el sistema nervioso periférico (Meyer, 2013; Wockner et al., 2014). De manera interesante, en estos genes también se ha detectado un incremento en la unión de proteínas involucradas en el silenciamiento de genes, como es el caso de MeCP2, una proteína con dominios de unión a ADN metilado (Zhubi et al., 2014).

Al igual que ocurre en pacientes, el tratamiento con Poly I:C genera cambios en el patrón de metilación y de hidroximetilación en genes como GAD1 y 2 y Disc1, todos involucrados en autismo y esquizofrenia (Labouesse et al., 2015). Incluso se ha encontrado metilación diferencial en genes involucrados con el silenciamiento genético, como LINE1 y MeCP2, si bien las diferencias se dan sólo en ciertas regiones del cerebro y varían entre sexos (Basil et al., 2014). El paisaje epigenético también se ve alterado a nivel de marcas en las colas de histonas en estos modelos de AIM. Este es el caso de marcas como H3K4me3, H3K9-14ac y H4K8ac, donde, a pesar de que los cambios son sutiles, estos se asocian con alteraciones en el comportamiento de los individuos y la expresión de genes involucrados en la señalización de glutamato (Connor et al., 2012; Tang et al., 2013). Dado que el patrón epigenético cambia dependiendo de la región del cerebro que se analice, así como de la edad y sexo del individuo, una intención futura de este trabajo de investigación es determinar el paisaje epigenético a nivel de genoma completo, distinguiendo entre regiones del cerebro, sexo y tipo celular, separando neuronas, microglía y astrogliá en el caso más ambicioso.

Finalmente, para poder aseverar que el insulto inflamatorio fue puntual, pasajero y que no continúa afectando el funcionamiento neuronal, era necesario evaluar el perfil inflamatorio de la descendencia adulta tanto a nivel periférico como central. Para este fin se midió la concentración de las tres principales citocinas pro-inflamatorias: IL-1 β , IL-6 y TNF en suero sanguíneo y en corteza cerebral. Se esperaba la posibilidad de que no hubiera un incremento significativo en la expresión de estas citocinas en la descendencia de inflamación materna, sin embargo, fue un tanto sorprendente la tendencia de TNF e IL-6 a disminuir en las hembras y machos bajo este tratamiento, respectivamente (Fig. 30). Es muy probable que, al igual que con el estrés psicológico, la respuesta de estos animales ante nuevos insultos inflamatorios como infecciones virales o bacterianas, no sea la más adecuada, inclusive el estrés psicológico podría conducir a un incremento en el estado pro-inflamatorio de estos individuos. Si bien no se determinó el perfil anti-inflamatorio, se ha demostrado que este también puede ser detrimental para el comportamiento de los ratones (Meyer *et al.*, 2008). Se sabe que en el cerebro de la progenie tratada con Poly I:C hay incremento en los niveles de citocinas pro y anti-inflamatorias dentro de las primeras 24 horas postinyección, aún cuando estos varían dependiendo del momento de gestación donde se realiza la administración e incluso de la vía de administración (Meyer *et al.*, 2006). A pesar de esto, no se encontró diferencia alguna en la concentración de TNF en la progenie adulta en concordancia con otros estudios (Meyer *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que en la edad adulta hay alteración en el comportamiento a causa de la inflamación materna sin que esta inflamación siga presente, sustentando la posibilidad de que una forma en la que este insulto deja una “marca” en el cerebro de la progenie es a nivel epigenético en genes clave para la correcta neurotransmisión.

En conjunto con los resultados obtenidos en el presente estudio se requieren de futuras investigaciones para evaluar si la progenie expuesta a un insulto inflamatorio en etapa gestacional responde de manera exacerbada a una condición de estrés, de tal forma que se pueda comprobar que ésta progenie esté preconditionada a desarrollar en la adultez cambios de comportamiento (esquizofrenia-autismo) como resultado de la AIM. Si bien en estudios anteriores ya se ha evaluado el aumento en la producción de citocinas tras la inyección gestacional de Poly I:C (Meyer *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2008), sería importante determinar el perfil inflamatorio en nuestras hembras gestantes y sus embriones a las pocas horas de la administración de Poly I:C, tomando en cuenta que para este fin se deben sacrificar a los animales y no es posible evaluar a la progenie en etapa adulta. Adicionalmente, se propone medir la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo de los neurotransmisores evaluados, así como realizar ensayos en donde se compruebe si cada neurotransmisor se encuentra en la terminal pre o postsináptica y si realmente se está liberando y actuando a través de sus respectivos receptores. Finalmente, se sugiere que en futuros experimentos se tenga en cuenta realizar las pruebas conductuales y bioquímicas en hembras cuando todas se encuentren en la misma etapa de su ciclo estral. En machos se asume que no hay un ciclo hormonal similar que pueda interferir con los resultados, sin embargo, también será importante tenerlo en cuenta.

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró reproducir el efecto en el comportamiento provocado por la administración de Poly I:C gestacional reportado previamente para modelos murinos. Además, se identificó por primera vez que los cambios en el comportamiento como resultado de la administración de Poly I:C en etapa gestacional, difieren entre hembras y machos. Estos hallazgos son de vanguardia y se insertan en el interés actual de incluir ambos sexos en la caracterización de numerosos procesos biológicos.

En este estudio se observó que en ambos sexos se dio una marcada respuesta antisocial evaluada en la prueba de tres cámaras, exacerbándose el efecto en las hembras, en quienes el recambio dopaminérgico cortical fue más lento y se relacionó directamente con el tiempo de interacción de los individuos con un ratón desconocido. Dado que el déficit de dopamina también se presentó en estriado, es probable que existan fallas en los circuitos mesocorticales que, junto con la señalización de serotonina y oxitocina, influyen negativamente en la respuesta social. La hipótesis se refuerza por la baja en el glutamato y aspartato hipocampal, característico de pacientes esquizofrénicos. Por otro lado, encontramos que los machos presentan una afección en los circuitos de recompensa y motivación, reflejado en una menor preferencia a un estímulo placentero como la sacarosa y un acelerado metabolismo de dopamina y glutamato en hipocampo.

Finalmente, aunque no observamos cambios en los niveles de citocinas pro-inflamatorias ni en suero ni en corteza cerebral de la progenie adulta, sería interesante exponer a estos animales a un segundo insulto y determinar si esto resulta en cambios exacerbados en el comportamiento y si esto es diferencial entre hembras y machos.

VIII. PERSPECTIVAS

- Someter a los ratones tratados con Poly I:C a pruebas de estrés psicológico, tales como restricción de movimiento, choques eléctricos sin condicionamiento, pruebas de nado forzado, etcétera, evaluando si existe cambio en su comportamiento y en la concentración de neurotransmisores inmediatamente terminadas las pruebas.
- Medir si existen cambios exacerbados en la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias tras inducir un insulto inflamatorio como la inyección de LPS intraperitoneal, así como su afección en pruebas de memoria y actividad motora.
- Ampliar el número de zonas cerebrales en las que se analice la concentración de neurotransmisores, añadiendo cerebro medio, cerebelo y dividiendo entre corteza media y prefrontal, así como distinguir entre hemisferios izquierdo y derecho.
- Determinar el paisaje epigenético a nivel de genoma completo en neuronas aisladas de zonas específicas del cerebro de los ratones sometidos a AIM, así como la eventual determinación en astrogliá y microglía.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdolmaleky HM, Cheng K, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F, Smith CL, Shafa R, Aebi B, Carnevale J, Pan H, Papageorgis P, Ponte JF, Sivaraman V, Tsuang MT, Thiagalingam S (2006) Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics* 15:3132–3145
- Akbarian S (2014) Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 16:405-417
- al-Haddad BJS, Jacobsson B, Chabra S, Modzelewska D, Olson EM, Bernier R, Enquobahrie DA, Hagberg H, Östling S, Rajagopal L, Adams KM, Sengpiel V (2019) Long-term risk of neuropsychiatric disease after exposure to infection in utero. *JAMA Psychiatry*
- American Psychiatric Association (2013) Schizophrenia spectrum and other psychotic disorders. In: American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing 87-122.
- Arnsten AFT (2011) Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29:215-223
- Basil P, Li Q, Dempster EL, Mill J, Sham PC, Wong CCY, McAlonan GM (2014) Prenatal maternal immune activation causes epigenetic differences in adolescent mouse brain. *Translational Psychiatry* 4:e434
- Bauman MD, Iosif AM, Smith SEP, Bregere C, Amaral DG, Patterson PH (2014) Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biological Psychiatry* 75:332-341
- Becerra-Partida OF (2014) La salud mental en México, una perspectiva, histórica, jurídica y bioética. *Persona y bioética* 18:238-253
- Bhat S, Acharya UR, Adeli H, Bairy GM, Adeli A (2014) Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. *Reviews in the Neurosciences* 25:841-850
- Brown AS, Derkits EJ (2010) Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry* 167:261-280
- Buffington SA, Viana G, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M (2016) Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* 165:1762–1775
- Çakir Y (2017) Modeling influences of dopamine on synchronization behavior of striatum. *Network: Computation in Neural Systems* 28:28-52
- Chen WW, Zhang X, Huang WJ (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular Medicine Reports* 13:3391-3396

- Connolly N, Anixt J, Manning P, Lin DP, Marsolo KA, Bowers K (2016) Maternal metabolic risk factors for autism spectrum disorder—an analysis of electronic medical records and linked birth data. *Autism Research* 9:829-837
- Connor CM, Dincer A, Straubhaar J, Galler JR, Houston IB, Akbarian S (2012) Maternal immune activation alters behavior in adult offspring, with subtle changes in the cortical transcriptome and epigenome. *Schizophrenia Research* 140:175-184
- Crawley JN (2007) Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology* 17:448-459
- Dölen G (2015) Autism: Oxytocin, serotonin, and social reward. *Social Neuroscience* 10:450-465
- Escandón R (2000) ¿Qué es salud mental? (Un panorama de la salud mental en México). En Castillo Nechar M. Coordinador. Salud mental, sociedad contemporánea. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Fitzgerald PJ (2014) Is elevated norepinephrine an etiological factor in some cases of schizophrenia? *Psychiatry Research* 215:497-504
- Foro Consultivo Científico y Tecnológico (2018) Salud mental en México. *INCYTU* 7:1-6
- Forsberg SL, Ilieva M, Michel TM (2018) Epigenetics and cerebral organoids: promising directions in autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry* 8:14
- Freudenreich O, Brown HE, Holt DJ (2016) Psychosis and schizophrenia. In: Stern TA, Fava M, Wilens TE, Rosenbaum JF, eds. *Massachusetts General Hospital Comprehensive Clinical Psychiatry*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier. chap 28.
- Garay PA, McAllister AK (2010) Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2:1-16
- Gregory SG, Connelly JJ, Towers AJ, Jhonson J, Biscocho D, Markunas CA, Lintas C, Abramson RK, Wright HH, Ellis P, Langford CF, Worley G, Delong GR, Murphy SK, Cuccaro ML, Persico A, Pericak-Vance MA (2009) Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Medicine* 7:62
- Hajos-Korcsok E, Robinson DD, Yu JH, Fitch CS, Walker E, Merchant KM (2003) Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74:609-616
- Harte M, O'Connor WT (2004) Evidence for a differential medial prefrontal dopamine D1 and D2 receptor regulation of local and ventral tegmental glutamate and GABA release: A dual probe microdialysis study in the awake rat. *Brain research* 1017:120-129
- Herring BE, Silm K, Edwards RH, Nicoll RA (2015) Is aspartate an excitatory neurotransmitter?. *The Journal of Neuroscience* 35:10168-10171

- Howes OD, McCutcheon R, Owen MJ, Murray RM (2017) The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 81:9-20
- Hsiao EY, Patterson PH (2011) Activation of the Maternal Immune System Induces Endocrine Changes in the Placenta via IL-6. *Brain, Behavior and Immunology* 25:604-615.
- Hsiao EY, Patterson PH (2012) Placental Regulation of Maternal-Fetal Interactions and Brain Development. *Developmental Neurobiology* 72:1317-1326
- Huang HS, Akbarian S (2007) GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *PloS ONE* 2:8
- Jiang H, Xu L, Shao L, Xia R, Yu Z, Ling Z, Yang F, Deng M, Ruan B (2016) Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior and Immunity* 58:165-172
- Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen EP (2014) Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology* 10:643-660
- Kong WX, Chen SW, Li YL, Zhang YJ, Wang R, Min L, Xiaojuan M (2006) Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 83:271-276
- Kopp BL, Wick D, Herman JP (2013) Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiology & Behavior* 0:1-17
- Labouesse MA, Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Meyer U (2015) Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics* 10:1143-1155
- Lee BK, Magnusson C, Gardner RM, Blomström Å, Newschaffer CJ, Burstyn I, Karlsson H, Dalman C (2015) Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior and Immunity* 44:100-105
- Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH (2012) Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior and Immunity* 26:607-616
- Mandal M, Marzouk AC, Donnelly R, Ponzio NM (2011) Maternal immune stimulation during pregnancy affects adaptive immunity in offspring to promote development of TH17 cells. *Brain, Behavior and Immunity* 25:863-871
- Mazina V, Gerds J, Trinh S, Ankenman K, Ward T, Dennis MY, Girirajan S, Eichler EE, Bernier R (2015) Interactive effects of copy number variation and maternal infection on autism impairment. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics* 36:61-67
- McPartland J, Volkmar FR (2012) Autism and related disorders. *Handbook of Clinical Neurology* 106:1-18

- Medina-Mora MA, Borges G, Benjet C, Lara C, Berglund P (2007) Psychiatric disorders in Mexico: Lifetime prevalence in a nationally representative sample. *The British Journal of Psychiatry* 190:521-528
- Meyer U (2013) Developmental neuroinflammation and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 42:20–34
- Meyer U (2014) Prenatal poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological Psychiatry* 75:307-315
- Meyer U, Feldon J (2012) To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 62:1308-1321
- Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, Yee BK, Schedlowski M, Feldon J (2008) Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Molecular Psychiatry* 13:208-221
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J (2006) The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *The Journal of Neuroscience* 26:4752-4762
- Meyer U, Nyffeler M, Schwendener S, Knuesel I, Yee BK, Feldon J (2008) Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 33: 441-456
- Mitchell WM, Nicodemus CF, Carter WA, Horvath JC, Strayer DR (2014) Discordant biological and toxicological species responses to TLR3 activation. *The American Journal of Pathology* 184:1062-1072
- Muller CL, Anacker AMJ, Veenstra-VanderWeele J (2016) The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience* 321:24-41
- Mureau MH, Olsen RW (1991) Taurine acts on a subclass of GABA_A receptors in mammalian brain in vitro. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 207:9-16
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke NINDS (2016) Autism spectrum disorders *Office of Communications and Public Liaison*
- OMS (2017) Mental Health Fact Sheet
- ONU (2015) Objetivos del Desarrollo Sostenible
- Ovenden ES, McGregor NW, Emsley RA, Warnich L (2018) DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: Progress and future directions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 81:38-49
- Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura K, Iyo M (2006) Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive

- impairment in the offspring: A neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 59:546-554
- Patterson PH (2011) Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine* 17:389-394
- Piepponen TP, Skujins A (2001) Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and γ -aminobutyric acid by high-performance liquid chromatography fluorescence detection with o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 757:277-283
- Qi Z, Miller GW, Voit EO (2008) Computational Systems Analysis of Dopamine Metabolism. *PLoS ONE* 3:e2444
- Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinsk F, Quevedo J (2015) The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience* 300:141-154
- Rivera HM, Christiansen KJ, Sullivan EL (2015) The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience* 9:194
- Robbins TW (2005) Synthesizing schizophrenia: a bottom-up, symptomatic approach. *Schizophrenia Bulletin* 31:854-864
- Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments* e52434:1-6
- Seidman LJ, Mirsky AF (2017) Evolving notions of schizophrenia as a developmental neurocognitive disorder. *Journal of the International Neuropsychological Society* 23:881-892
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN (2010) Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience* 11:490-502
- Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *Journal of Neuroscience* 27:10695-10702
- Sperk G (1982) Simultaneous determination of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Neurochemistry* 38:840-843
- Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Ciani E, Bartesaghi R (2015) Timing of therapies for Down syndrome: the sooner, the better. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9:1-18
- Tang B, Jia H, Kast RJ, Thomas EA (2013) Epigenetic changes at gene promoters in response to immune activation in utero. *Brain, Behavior and Immunity* 30:168-175
- Toru M, Watanabe S, Shibuya H, Nishikawa T, Noda K, Mitsushio H, Ichikawa H, Kurumaji A, Takashima M, Mataga M, Ogawa A (1988) Neurotransmitters, receptors and

neuropeptides in post-mortem brains of chronic schizophrenic patients. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 78:121-137

Wei Y, Yang CR, Wei YP, Ge ZJ, Zhao ZA, Zhang B, Hou Y, Schatten H, Sun QY (2015) Enriched environment-induced maternal weight loss reprograms metabolic gene expression in mouse offspring. *Journal of Biological Chemistry* 290:4604-4619

Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U (2009) Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 12:513-524

Wockner LF, Noble EP, Lawford BR, Young RMcD, Morris CP, Whitehall VLJ, Voisey J (2014) Genome-wide DNA methylation analysis of human brain tissue from schizophrenia patients. *Translational Psychiatry* 4:1-8

Wu WL, Hsiao EY, Yan Z, Mazmanian SK, Patterson PH (2017) The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain, Behavior and Immunity* 62:11-23

Zhubi A, Chen Y, Dong E, Cook EH, Guidotti A, Grayson DR (2014) Increased binding of MeCP2 to the GAD1 and RELN promoters may be mediated by an enrichment of 5-hmC in autism spectrum disorder (ASD) cerebellum. *Translational Psychiatry* 4:e349

Zuckerman L, Weiner I (2005) Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *Journal of Psychiatric Research* 39:311-323