



**ANÁLISIS DE LA NEUROGÉNESIS DE NEURONAS  
INHIBITORIAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO  
EN UN MODELO MURINO DE ACTIVACIÓN INMUNE  
MATERNA Y SU IMPLICACIÓN EN EL TRASTORNO DEL  
ESPECTRO AUTISTA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN FISIOLÓGÍA Y NEUROCIENCIAS UNIVERSIDAD DE  
SEVILLA**

**ROSA LÓPEZ DOMINGO**

**TUTOR ACADÉMICO: Pablo García Miranda**

**TUTOR EXTERNO: Diego García González (Instituto de Biomedicina de Sevilla)**

**LUGAR DE REALIZACIÓN: Instituto de Biomedicina de Sevilla**

**FECHA DE DURACIÓN: febrero-noviembre de 2023**

**FECHA DE PRESENTACIÓN: 6 de noviembre de 2023**







## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO EN MAMÍFEROS.....	4
1.1 Neurodesarrollo.....	4
1.2. Neurogénesis.....	4
1.2.1 Neurogénesis de los diferentes tipos neuronales e interneuronas .....	5
1.3 Neurogénesis de los ganglios basales .....	5
1.3.1 Funciones de los ganglios basales.....	8
2. TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO: TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA .....	10
2.1 Criterios diagnósticos.....	10
2.2 Prevalencia.....	11
2.3 Etiología.....	11
3. ACTIVACIÓN INMUNITARIA MATERNA .....	12
3.1 Modelos animales .....	13
4. ESTUDIOS PREVIOS DE MIA-TEA Y TEA-NEURODESARROLLO ESTRIATAL .....	14
4.1 TEA y neurodesarrollo estriatal .....	14
4.2 Influencia de la MIA en el TEA.....	16
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
1. ANIMALES UTILIZADOS .....	17
2. MODELO DE MIA .....	18
3. DATACIÓN DE CÉLULAS .....	18
4. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO .....	19
4.1. Anestesia, fijación del tejido y sacrificio .....	19
4.2 Corte del tejido.....	19
4.3 Anticuerpos .....	19
4.4 Montaje .....	21
4.5 Visualización en el microscopio y cuantificación neuronal.....	21
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	21
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	22

1. ESTUDIO PREVIO DE LA ANATOMÍA Y ORGANIZACIÓN NEURONAL DEL CUERPO ESTRIADO .....	22
2. INFLUENCIA DE LA MIA EN LA NEUROGÉNESIS DEL NAc.....	23
2.1 Neurogénesis de las neuronas medianas espinosas de proyección .....	23
2.2 Neurogénesis de las interneuronas que expresan parvalbúmina .....	24
3. ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN NEURONAL EN EL EJE ROSTRO-CAUDAL	25
<b>V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>28</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA .....</b>	<b>29</b>

## **RESUMEN**

El trastorno del espectro autista (TEA) se origina durante el neurodesarrollo y se caracteriza por dificultades en las interacciones sociales, la comunicación y la presencia de patrones de movimiento repetitivos (estereotipias). Su etiología sigue siendo desconocida para la comunidad científica, aunque se sabe que el ambiente es uno de los factores que influyen en él. Si bien está muy estudiado el factor ambiental en el desarrollo de las áreas corticales implicadas en las características de este trastorno, apenas hay investigaciones centradas en las áreas subcorticales.

Este trabajo estudió la influencia de las infecciones maternas como posible factor ambiental en el neurodesarrollo del núcleo accumbens, una de las regiones subcorticales encargadas del control de la actividad motora, con una posible implicación en las estereotipias del TEA. Para ello, se usó un modelo animal preclínico de activación inmune materna, al cual se le inyectó un compuesto para simular una infección viral. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se estudió el neurodesarrollo de las neuronas inhibitorias de esta región en la descendencia y se determinó si esta perturbación en la gestación influyó en ella.

**Palabras clave:** neurogénesis, factores ambientales, infecciones maternas, trastorno del espectro autista, núcleo accumbens, neuronas inhibitorias, estereotipias.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### 1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO EN MAMÍFEROS

#### 1.1 Neurodesarrollo

El neurodesarrollo es el proceso de formación del sistema nervioso (SN), que consta de varias etapas como son la neurogénesis, la sinaptogénesis, proceso en el cual se establecen conexiones sinápticas neuronales y posterior eliminación de las mismas en exceso, conocido como poda sináptica (Budday et al., 2015; Molnár et al., 2019), y la mielinización, etapa en la cual se produce la envoltura de los axones de mielina por los oligodendrocitos (células macrogliales) para dar lugar a la sustancia blanca (Budday et al., 2015; Molnár et al., 2019).

En los mamíferos, el desarrollo del embrión empieza tras su implantación en el útero varios días después de la fecundación y, posteriormente, suceden una serie de procesos que dan lugar a las diferentes capas de tejido embrionario (ectodermo, mesodermo y endodermo), de las cuales se originan los órganos y tejidos del futuro individuo.

En una de las fases, se produce la proliferación de las células del ectodermo que están en contacto con el mesodermo para dar lugar a la placa neural. Esta se pliega sobre sí misma formando lo que se denomina tubo neural. Este sufre un proceso de diferenciación que da lugar a las diferentes estructuras del sistema nervioso (Delhaye-Bouchaud, 2001; Silbereis et al., 2016).

#### 1.2. Neurogénesis

Tras la diferenciación del tubo neural, se produce la neurogénesis, que es la etapa en la cual se originan, proliferan y migran los diferentes tipos neuronales hacia sus lugares definitivos. El tubo neural está recubierto por un epitelio pseudoestratificado de células madre neuroepiteliales, formando la llamada zona ventricular (VZ), que presentan una gran capacidad de división. Conforme proliferan, se van colocando debajo de esta zona para formar otra capa de células también proliferativas, la zona subventricular (SVZ). Las células que salen de esta zona dan lugar a las neuronas de proyección.

Las células de la VZ y SVZ, que se transformarán en células gliales radiales y se extienden hasta la pared cortical, son el origen de las futuras neuronas y macroglía. Presentan dos tipos de divisiones celulares: simétrica y asimétrica. En primer lugar, se produce la división simétrica, en la que una célula da lugar a dos nuevas células progenitoras, y así sucesivamente para autorrenovarse y aumentar el grosor de la zona ventricular. Posteriormente, cambian al



tipo de división asimétrica. En ella, una de las células hijas se queda en la zona ventricular como célula de glía radial y la otra se convierte en una célula progenitora intermedia que dará lugar a los neuroblastos (neuronas inmaduras) (Budday et al., 2015; Jiang and Nardelli, 2016). Los neuroblastos expresan la doblecortina (DCX) en su migración en el estadio embrionario y en la zona subventricular en el adulto (Yang et al., 2004).

### 1.2.1 Neurogénesis de los diferentes tipos neuronales e interneuronas

El telencéfalo de los mamíferos se divide en dos regiones: el palio, correspondiente a la parte dorsal y que da lugar a las áreas corticales, y el subpalio, en la región ventral, que corresponde con las regiones subcorticales (tálamo, hipotálamo, ganglios basales, hipocampo, amígdala, cerebelo y el tronco del encéfalo) (Jiang and Nardelli, 2016). Del subpalio se originan los diferentes tipos neuronales, que, dependiendo del neurotransmisor que liberan en los procesos de sinapsis, pueden ser excitatorias o inhibitorias.

Las neuronas excitatorias (piramidales), cuyo neurotransmisor es el glutamato, se originan en el palio y darán lugar a las seis capas corticales (Jiang and Nardelli, 2016).

Las neuronas inhibitorias, cuyo neurotransmisor es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), se originan en el subpalio, en el cual se encuentran regiones neurogénicas como son las eminencias ganglionares y la región preóptica, y migran hacia las áreas corticales (Lim et al., 2018; Silbereis et al., 2016). En los ganglios basales y en la amígdala, hay neuronas inhibitorias de proyección que conectan regiones del cerebro, y las interneuronas, un tipo neuronal que modula la actividad de los circuitos locales (Budday et al., 2015).

### 1.3 Neurogénesis de los ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos en el subpalio de los mamíferos que están formados por el cuerpo estriado (en su parte dorsal contiene a los núcleos caudado y lenticular [putamen y globo pálido] y en su parte ventral, al núcleo accumbens (Nac) [en esta región se centró centrar este trabajo] y al tubérculo olfatorio), los núcleos subtalámicos y la sustancia nigra (Thabault et al., 2022).

El cuerpo estriado está compuesto por una matriz y por los compartimentos del estriosoma. La matriz contiene a las neuronas medianas de proyección espinosas GABAérgicas (MSN) que reciben la información procedente de las vías corticales. Estas neuronas son de dos tipos principales: las pertenecientes a la vía directa (promueven la actividad motora), que expresan los receptores de dopamina D1 y proyectan hacia la parte interna del globo pálido y la

sustancia nigra, y las de vía indirecta (inhiben la actividad motora), que expresan el receptor D2 y proyectan a la parte externa del globo pálido (Fuccillo, 2016; Li and Pozzo-Miller, 2020). También contiene interneuronas colinérgicas excitatorias e interneuronas GABAérgicas inhibitorias dependientes de calcio, ambas responsables en la modulación de la información de entrada al estriado. De estas últimas, hay cuatro tipos que expresan parvalbúmina (PV), somatostatina (SST), calretinina (CR) y tirosina hidroxilasa (TH) (Li and Pozzo-Miller, 2020; Lim et al., 2018; Molnár et al., 2019).

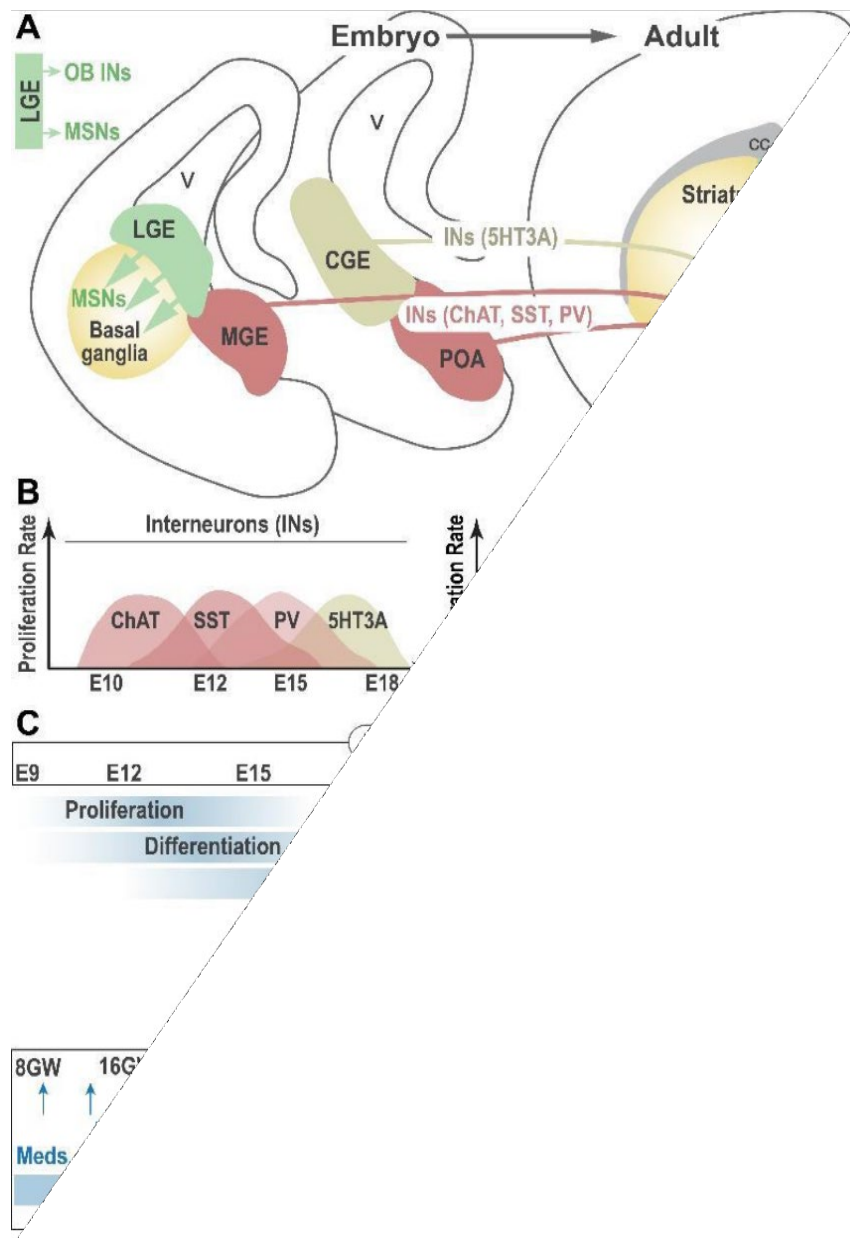
- Parvalbúmina (PV): estas interneuronas inhibitorias participan en la función estriatal de la búsqueda de recompensa y en la regulación de la actividad motora (Nahar et al., 2021).
- Somatostatina (SST): tienen un papel importante en la integración sensoriomotora, así como también en el aprendizaje y la memoria. En el cuerpo estriado participan en el aprendizaje por recompensa, el movimiento voluntario dirigido a objetos y en la adquisición de hábitos (Cattaneo et al., 2019).
- Calretinina (CR): constituyen entre el 10 % y 30 % de las interneuronas GABAérgicas y presentan una morfología variable en los ratones. Se desconocen las funciones que desempeñan a nivel de comportamiento (Cauli et al., 2014).
- Tirosina hidroxilasa (TH): se desconoce su papel en el comportamiento del individuo, pero se ha visto en experimentos que, si se lesionan, afectan a la actividad motora dirigida hacia los objetos. Presentan el receptor de dopamina, aunque no son dopaminérgicas, y reciben información excitadora por parte del tálamo. Se encuentran tanto en el cuerpo estriado dorsal como ventral, aunque la mayoría de ellas se localizan en la matriz del estriado dorsal (Kaminer et al., 2019).

Tanto las neuronas MSN (desde E10.5 hasta E18.5 en ratones) como las interneuronas (desde aproximadamente E9.5 hasta E18 en ratones) se originan en las zonas neurogénicas del subpallio, que están formadas por la región preóptica, el tabique y las eminencias ganglionares (**Figura 1**) (Knowles et al., 2021; Lim et al., 2018). Estas últimas se dividen en:

- Eminencia ganglionar lateral (LGE): da lugar a las neuronas medianas de proyección (MSNs) GABAérgicas y a algunas interneuronas del estriado. Las MSNs forman alrededor del 95% del cuerpo estriado y su neurogénesis da lugar a subgrupos en tres tiempos sucesivos: las que nacen alrededor de E11 se ubican cerca de los estriosomas, las que nacen en E14 se colocan en la matriz estriosómica, y las que nacen de forma tardía en E17 se disponen en los compartimentos anulares cercanos a los estriosomas (**Figura 1B**) (Knowles et al., 2021; Matsushima and Graybiel, 2020). La identificación de las MSNs se

realiza mediante la técnica de inmunohistoquímica con el marcaje anti-DARPP-32. La DARPP-32 es una fosfoproteína dependiente de dopamina y adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que es regulada por la activación del receptor dopaminérgico D1 de las MSNs (Greengard et al., 1999).

- Eminencia ganglionar medial (MGE): origina las interneuronas GABAérgicas de tipo PV en su parte dorsal (alcanzan su pico de proliferación máxima aproximadamente en E12) y SST en su parte ventral (alcanzan el pico de proliferación máxima aproximadamente en E14), y a las interneuronas colinérgicas (se originan antes de E12) (**Figura 1B**)(Chen et al., 2010; Knowles et al., 2021; Mi et al., 2018).<
- Eminencia ganglionar caudal (CGE): produce las interneuronas inhibitorias de tipo CR (aproximadamente a partir de E15 en ratones) y a las interneuronas que expresan el receptor de serotonina 5HT3A (**Figura 1B**) (Knowles et al., 2021; Lim et al., 2018).



**Figura 1:** Esquema del neurodesarrollo de los ganglios basales. **A** Regiones de origen de las neuronas inhibitorias. Abreviaciones: 5HT3A, receptor de serotonina 3A; cc, cuerpo calloso; ChAT, neurona colinérgica; CGE, eminencia ganglionar caudal; LGE, eminencia ganglionar lateral; MGE, eminencia ganglionar medial; MSN, neuronas de espinas medianas; NAc, núcleo accumbens; POA, área preóptica; PV, parvalbúmina; SST, somatostatina; v, ventrículo. **B** Ratios de proliferación de las MSNs y de las interneuronas desde las eminencias ganglionares hasta sus destinos definitivos. **C** Comparativa temporal de la neurogénesis en ratones y humanos (Adaptada de Knowles et al., 2021).

### 1.3.1 Funciones de los ganglios basales

- Regulación de las acciones motoras: Están implicados en la selección de un determinado patrón motor en función de la rapidez de respuesta y del nivel de atención que se requiere para ejecutarla (Fuccillo, 2016). Pueden ser acciones dirigidas hacia un objetivo, cuya

respuesta es lenta, en una serie de pasos y requiere mucha atención, o acciones automáticas, que se ejecutan de forma rápida y no necesitan prestar atención. Dependiendo del tipo de respuesta que se requiere, se activan circuitos específicos:

1. Control sensoriomotor: se encarga de seleccionar los patrones motores de conductas automáticas. Está formado por la interacción entre la corteza somatosensorial, el cuerpo estriado (concretamente el núcleo putamen) y el tálamo (lugar de relevo de la información entre la corteza y los ganglios basales).
2. Circuito asociativo: es el responsable de las acciones motoras dirigidas hacia un objetivo y de la toma de decisiones. Se origina en la corteza prefrontal dorsolateral y orbitofrontal medial y lateral, y continúa hacia el cuerpo estriado, concretamente hacia el núcleo caudado, y finalmente llega al tálamo (Ganglia et al., 2017).

En ambos circuitos también interviene la amígdala, que es la responsable de las conductas dirigidas por las emociones y de las implicadas en la supervivencia del individuo. En ratones a los que se les lesiona esta región, se observan alteraciones en el equilibrio entre las respuestas dirigidas a un fin y las automáticas (Fuccillo, 2016).

- Control del comportamiento mediante su interacción con el sistema límbico: todos los estímulos del entorno son procesados por el sistema nervioso, cuya vía de entrada son los órganos de los sentidos. El resultado es una respuesta que permite al individuo adaptarse al entorno. Hay varios niveles de regulación del comportamiento y los ganglios basales participan en uno de ellos. La información procesada por las cortezas correspondientes es enviada a los ganglios basales por medio del tálamo. En ellos, gracias a las vías directas e indirectas de las MSNs y a las interneuronas glutamatérgicas, se puede modificar la información y seleccionar la respuesta motora adecuada. Este circuito corticoestriatal también se conecta con la amígdala (Fuccillo, 2016; Ganglia et al., 2017).
- Comportamientos guiados por una recompensa: los ganglios basales interaccionan con los sistemas dopaminérgicos para reforzar aquellas conductas motoras que son beneficiosas para el individuo (obtienen una recompensa). El NAc recibe información del área tegmental ventral (sistema dopaminérgico), del hipocampo y del hipotálamo, y la manda de vuelta al hipotálamo y al área tegmental ventral (Fuccillo, 2016; Ganglia et al., 2017).

Las disfunciones en los ganglios basales se relacionan con diversos trastornos psiquiátricos entre los que se encuentran la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Párkinson, el déficit

de atención con hiperactividad (TDAH), el trastorno del espectro autista (TEA) (en el que enfocó este trabajo), la esquizofrenia, el trastorno obsesivo-compulsivo y la distonía primaria generalizada; y también con síndromes genéticos como el X frágil, síndrome de Rett y síndrome de Tourette, entre otros (Fuccillo, 2016; Ganglia et al., 2017; Langen et al., 2009; Li and Pozzo-Miller, 2020; Thabault et al., 2022).

## 2. TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO: TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

Los trastornos del neurodesarrollo son un conjunto de alteraciones neurológicas que aparecen en la infancia y perduran durante toda la vida. Los conforman algunas discapacidades intelectuales, el trastorno del espectro autista (TEA), el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), los trastornos de la comunicación, el trastorno específico del lenguaje (TEL) y los trastornos motores (Morris-Rosendahl and Crocq, 2020).

El TEA es un trastorno del neurodesarrollo descrito bibliográficamente por primera vez por el psiquiatra austríaco Leo Kanner en 1943, en su libro “Trastornos autistas del contacto afectivo” (Baj et al., 2021).

### 2.1 Criterios diagnósticos

Según la quinta edición del manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la American Psychiatric Association (DSM-V), los criterios diagnósticos de este trastorno son:

- Déficit en la interacción y comunicación social: se incluyen aspectos como la reciprocidad emocional, el inicio y mantenimiento de conversaciones, la comunicación no verbal en dicha relación, la dificultad para entender el contexto social, entre otras.
- Patrones de comportamiento repetitivo (estereotipia) e intereses restringidos: se destaca la monotonía, la escasa flexibilidad mental ante situaciones de cambios e imprevistos, una excesiva intensidad en los intereses restringidos y la hiper/hipo reactividad ante estímulos diversos.
- Dicho cuadro debe manifestarse en los primeros años de vida como norma general, aunque hay excepciones.
- Las características descritas causan deterioro en áreas de funcionamiento diario (Hervás and Maraver, 2021).

## 2.2 Prevalencia

Con respecto a su prevalencia a nivel mundial, los datos más recientes que se tienen son de 2018, del Centro de Prevención y Regulación de enfermedades (CDC) en EE. UU, que se estableció en 1 de cada 44 individuos (Centro de Prevención y Regulación de enfermedades [CDC], 2018). A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima la prevalencia actual en 1 de cada 160 niños, aunque estas cifras pueden variar según los países debido a los diferentes rangos de edad utilizados para los estudios (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2022).

Si se estudia la tasa de prevalencia entre niños y niñas, los datos actuales la establecen en 1 niña por cada 4 niños. Esto puede deberse a que el sexo femenino presenta más comorbilidades que coincide con otros trastornos psiquiátricos, lo que propicia que se les diagnostique con estos últimos, y no con autismo. También, el ser un grupo de población con mayor interacción social y más capacidad de imitación favorece que “camuflen” sus rasgos propios del autismo, pasando desapercibidas e infradiagnosticadas (Hervás et al., 2012; Zawadzka et al., 2021).

## 2.3 Etiología

Actualmente se desconoce el origen exacto del TEA, pero se sabe que es multifactorial, al igual que muchos trastornos psiquiátricos. Se da por la combinación de:

- Factores genéticos (10-20% de los casos): mutaciones en algunos genes que producen síndromes en los cuales los rasgos TEA están entre su sintomatología, como los genes del complejo TSC1/TSC2 (complejo de esclerosis tuberosa), el gen FMR1 presente en el síndrome X frágil, los genes de las vías de quinasa reguladas por señales extracelulares (ERK) (Zawadzka et al., 2021), mutaciones en las células germinales de los progenitores (Hall et al., 2023), mutaciones *de novo*, entre otros.
- Factores epigenéticos: mecanismos que modifican la expresión genética sin ser heredables, entre los que se encuentran acetilaciones de histonas, metilaciones del ADN y expresión de microARN, entre otros (Bergdolt and Dunaevsky, 2019).
- Factores ambientales: exposición a productos químicos, a contaminación atmosférica, edad de los progenitores (Zawadzka et al., 2021), dieta, estrés (Hall et al., 2023) o la activación inmunitaria materna durante la gestación, entre otros. Es en este último factor ambiental en el que se centró este trabajo de investigación.

A pesar de que se han citado algunos ejemplos de posibles factores implicados en el origen del TEA, no se puede aportar ningún dato definitivo, ya que es en estos últimos años cuando las investigaciones científicas de las bases neurobiológicas del TEA, y de otros trastornos del neurodesarrollo, han cobrado amplitud.

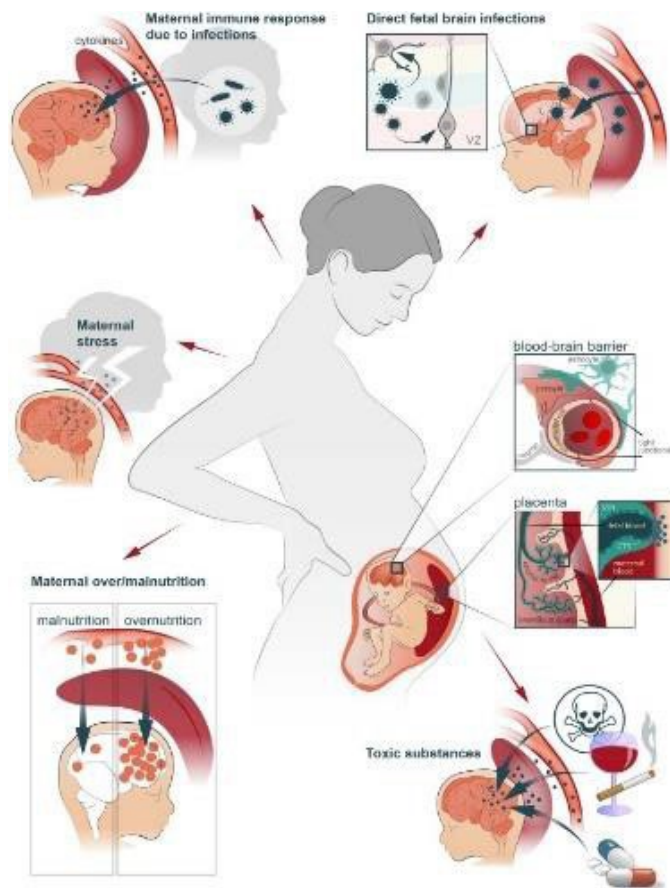
### 3. ACTIVACIÓN INMUNITARIA MATERNA

A nivel inmunitario, la gestación es un periodo muy especial. Para que sea llevado a término y evitar que el embrión sea rechazado, durante todo el proceso debe alcanzarse un equilibrio entre el sistema inmune materno y el del descendiente desde el momento de la implantación hasta el parto (Zawadzka et al., 2021). Esto es lo que se denomina tolerancia inmunitaria, y en ella participan las hormonas sexuales (los estrógenos inducen la producción de anticuerpos y reduce la liberación de las células *natural killers* y factores de necrosis tumoral), citoquinas, anticuerpos, proteínas inmunomoduladoras y células inmunocompetentes (linfocitos T reguladores, células *natural killer* y células dendríticas) (Baraña, 2011; Zawadzka et al., 2021).

Por todo ello, cualquier perturbación de este equilibrio puede desencadenar un parto prematuro (Hall et al., 2023) y producir alteraciones en el neurodesarrollo del descendiente (**Figura 2**).

Por tanto, la activación inmunitaria materna (MIA, por sus siglas en inglés) se define como la respuesta inmunitaria materna durante la gestación provocada por la infección por agentes patógenos (virus, bacterias o parásitos) (Hall et al., 2023), o la exposición a otros factores como el estrés, así como tener un índice de masa corporal alto que produce un estado inflamatorio en este periodo (Boulanger-Bertolus et al., 2018), entre otros. En consecuencia, se produce un aumento en los niveles de péptidos antimicrobianos proinflamatorios maternos (citoquinas y quimiocinas), que son capaces de atravesar la placenta y llegar al cerebro del embrión, ya que la barrera hematoencefálica en esta fase es muy permeable. Los péptidos más relevantes son la interleucina 6 (IL-6), la interleucina-17 (IL-17), la interleucina-1 $\beta$ , la interleucina-10 (IL-10), la interleucina-4 (IL-4), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Bergdolt and Dunaevsky, 2019; Massarali et al., 2022; Zawadzka et al., 2021).





**Figura 2:** Principales tipos de perturbaciones de origen materno que afectan al desarrollo cerebral del feto (Vasistha and Khodosevich, 2021) .

### 3.1 Modelos animales

Se han documentado en muchos estudios la existencia de una relación entre la MIA y las alteraciones del neurodesarrollo en humanos. Los datos que se tienen hasta la fecha son epidemiológicos, pero los mecanismos fisiológicos que hay detrás de ello siguen siendo desconocidos. En la actualidad, la investigación biomédica trata de aclarar esta incógnita mediante el uso de modelos animales (Brown and Meyer, 2018; Massarali et al., 2022).

Los primeros modelos se desarrollaron a partir de la exposición de ratones gestantes a virus como el de la influenza o a *Toxoplasma gondii* (Brown and Meyer, 2018; Massarali et al., 2022), pero hoy en día, se emplean compuestos que mimetizan infecciones virales o bacterianas como son:

- Ácido poliinosinico-policitidilico (Poly I:C): ARN de doble cadena sintético que se utiliza para simular una infección viral. Se une al receptor 3 de tipo Toll (TLR3) y provoca una cascada de reacciones que acaba con la activación de varios factores. Esto produce una

respuesta del sistema inmunitario que libera citoquinas para inhibir la replicación de este material genético (Hall et al., 2023; Massarali et al., 2022).

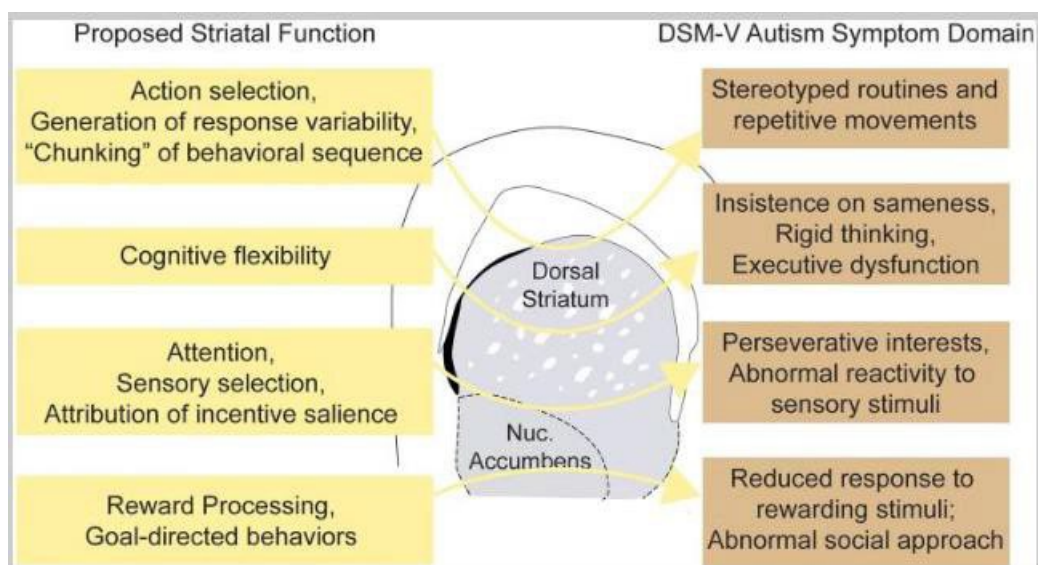
- **Lipopolisacárido (LPS):** endotoxina bacteriana que es componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas, que produce una respuesta inmune al unirse al receptor 4 de tipo Toll (TLR4) de igual manera que lo hace el Poly I:C (Massarali et al., 2022).

#### 4. ESTUDIOS PREVIOS DE MIA-TEA Y TEA-NEURODESARROLLOESTRIATAL

##### 4.1 TEA y neurodesarrollo estriatal

Como se ha mencionado anteriormente, el TEA se caracteriza por alteraciones en las áreas social, emocional y comunicativa, y en el control del movimiento corporal (presencia de patrones de movimientos repetitivos o estereotipias, que son movimientos rítmicos, prolongados y predecibles de alguna parte del cuerpo sin ninguna finalidad, y que cesan con la distracción del sujeto). Al tratarse de un trastorno del neurodesarrollo, diversos estudios han tratado de buscar alguna respuesta en la neurobiología del desarrollo cerebral para estas características. Hasta la fecha, los datos que se tienen para ello son los adquiridos a través de la realización de pruebas de imagen a niños con TEA.

La mayoría de ellos están enfocados a las primeras características, relacionadas con las áreas corticales. Pero hay muy pocos estudios centrados en las alteraciones del movimiento, que han sido asociadas a las áreas subcorticales, entre las que se encuentran los ganglios basales (**Figura 3**).



**Figura 3:** Principales funciones propuestas del estriado y las alteraciones de las mismas que se pueden encontrar en el trastorno del espectro autista (Fuccillo, 2016).

En modelos animales se ha demostrado que las anomalías en los circuitos corticoestriatales dan como resultado un mayor número de acicalamientos (patrones repetitivos) (Hegarty et al., 2020). En otro experimento, se generaron ratones mutantes *knock-out* para neuroligina-3 (una proteína de adhesión celular presente en las conexiones sinápticas que se ha asociado con el TEA) en MSNs del NAc, y se les puso en una barra giratoria (rotarod) para inducirles un patrón motor automático (colocación de las patas traseras para la marcha). En comparación con los ratones silvestres, los *knock-out* mostraron mayor rapidez de producir el patrón de marcha estereotipado (colocaron las patas traseras más rápido). A nivel molecular, en ellos se detectó que el déficit de conexiones sinápticas inhibitorias producido por la mutación alteraron el equilibrio sináptico excitatorio/inhibitorio en la región cerebral estudiada (Fuccillo, 2016).

En cuanto a los estudios realizados en niños, las pruebas de resonancia magnética muestran volúmenes del núcleo putamen y Nac aumentados en los niños TEA estudiados de hasta un 34 % con respecto a controles neurotípicos (Thabault et al., 2022). También se midieron los volúmenes del núcleo caudado y del NAc, y ambos aumentaron conforme avanzó el neurodesarrollo en los pacientes en el espectro autista en comparación con los sujetos controles, que en ellos disminuyó con la edad (Langen et al., 2009).

Otros estudios obtuvieron resultados contrarios a los comentados anteriormente: en una muestra procedente del grupo ENIGMA (Mejora de la genética de neuroimagen a través del metaanálisis) compuesta por 1.571 personas en el espectro y 1.651 personas controles (entre 2 a 64 años), se obtuvo unos volúmenes de núcleo putamen, globo pálido y núcleo accumbens más pequeños en TEA con respecto a los controles (Van Rooij et al., 2018). En otra investigación compuesta por 81 niños en el espectro autista menores de tres años y 45 niños neurotípicos utilizados como controles, recopilaron 85 imágenes de resonancia magnética y obtuvieron unos volúmenes del Nac más pequeños, así como unos ventrículos laterales aumentados en los niños autistas (Shiohama et al., 2022). Por todo ello, a pesar de que en algunos casos se han obtenido resultados significativos, de forma global no son concluyentes, por lo que se debería de seguir investigando el neurodesarrollo del área subcortical en este trastorno, así como los diferentes factores que lo pueden alterar.

## 4.2 Influencia de la MIA en el TEA

Aparte de los estudios sobre las alteraciones en la morfología cerebral en el TEA, otras líneas de investigación tratan de analizar la influencia de los factores ambientales en este trastorno del neurodesarrollo. Entre ellos se encuentran las perturbaciones intrauterinas, como la MIA. Los primeros datos de los que se tienen constancia de la relación entre la MIA y los trastornos del espectro autista en la descendencia se remontan a los años sesenta del siglo pasado. Después de la epidemia de rubéola que azotó EE-UU. en esa década, de los niños expuestos al patógeno durante el primer trimestre de embarazo, entre un 8% y 13% fueron diagnosticados de TEA tiempo después. Más adelante, otros estudios relacionaron las infecciones virales o bacterianas en el embarazo con un aumento en la probabilidad de la descendencia de tener TEA de un 12% (Zawadzka et al., 2021).

A nivel molecular, se han analizado diversas muestras de suero sanguíneo tanto en niños en el espectro como a sus madres en busca de posibles alteraciones. Se encontraron niveles de varias quimiocinas elevadas en estos niños, entre las que destacan IL-6, IL-17, IL-1b y IL-8 (que se relacionaron con patrones de conducta alterados entre los que se encuentran las interacciones sociales reducidas y los movimientos repetitivos), así como también el factor de necrosis tumoral alfa y la proteína C reactiva (PCR) (Boulangier-Bertolus et al., 2018; Hall et al., 2023; McLellan et al., 2022; Zawadzka et al., 2021). También se han encontrado estas interleucinas aumentadas en muestras de tejido cerebral post-mortem y de líquido cefalorraquídeo de pacientes en el espectro. Estos compuestos aumentan la permeabilidad y vulnerabilidad de la barrera hematoencefálica del embrión en desarrollo, provocando un desequilibrio entre las citoquinas maternas y fetales y, por consiguiente, alteraciones en el desarrollo cerebral (McLellan et al., 2022).

Los modelos animales de MIA confirman aún más esta relación. Aquellos animales que han sido expuestos a Poly I:C o a LPS durante la gestación, muestran niveles elevados de IL-6 (Hall et al., 2023; Patterson, 2011; Zawadzka et al., 2021), y en los test de comportamiento realizados posteriormente muestran pautas de comportamientos similares a la sintomatología TEA: reducción en la interacción social, aumento de las estereotipias (mayor acicalamiento o enterramiento de canicas), déficit en la comunicación y elevados niveles de ansiedad (Bergdolt and Dunaevsky, 2019; Carlezon et al., 2019; Hall et al., 2023; McLellan et al., 2022; Patterson, 2011).

Es importante destacar que, a pesar de la obtención de estos resultados, los efectos de la MIA en otras regiones del sistema nervioso central, así como los mecanismos fisiopatológicos que

induce durante el desarrollo del sistema nervioso del embrión, siguen siendo desconocidos en su mayor parte, y los estudios en humanos no permiten observar con detalle todo el proceso inmunitario. Por tanto, la investigación biomédica básica con los animales resulta esencial (Hall et al., 2023; Zawadzka et al., 2021) .

## **II. OBJETIVOS**

Partiendo de la existencia de una posible disfunción estriatal en el TEA (presencia de movimientos repetitivos), y la relación de este trastorno del neurodesarrollo con la MIA como uno de los posibles factores ambientales que contribuyen a su etiología, la hipótesis de este trabajo fue estudiar la neurogénesis de las MSNs e interneuronas inhibitorias del NAc en ratón, para ver si la MIA influyó en ellos, como posible causa de las estereotipias en el trastorno del espectro autista.

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### 1. ANIMALES UTILIZADOS.

Antes de empezar el experimento de este trabajo, se llevó a cabo un estudio previo de la anatomía y organización neuronal del cuerpo estriado. Para ello se utilizó un modelo de ratón de tipo GAD67-EGFP de 15 días de edad postnatal. El GAD (ácido glutámico descarboxilasa) es la enzima responsable de la síntesis del GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), principal neurotransmisor inhibitorio del cuerpo estriado.

Para el experimento de la influencia de la MIA en la neurogénesis estriatal, se utilizaron ratones de 22 días de edad postnatal (P22) descendientes de hembras silvestres (wild type, WT) consanguíneas de la cepa C57BL/6J. Dado que la ratio de diagnóstico del TEA por sexos es de 1 de cada 4, este estudio fue realizado en cuatro hembras gestantes, dos de las cuales fueron sometidas al tratamiento experimental y las otras dos, a una solución fisiológica como control. Hay que aclarar que una de las hembras no estuvo preñada, por lo que los resultados obtenidos son en base a las camadas de tres hembras. A continuación, se detallan los sexos de los descendientes de cada camada:

- Camada 1: 4 machos y 3 hembras.
- Camada 2: 4 machos y 3 hembras.
- Camada 3: 6 machos y 1 hembra.

## 2. MODELO DE MIA

La inducción de la MIA se llevó a cabo con el ácido polinosínico-policitídico (Poly I:C) para simular una infección viral. Para control, se empleó una solución de tampón fosfato salino (PBS 1X) que mantiene la osmolaridad celular y tisular.

## 3. DATACIÓN DE CÉLULAS

Para estudiar el efecto de la MIA en el origen y proliferación neuronal en la etapa postnatal, tras la inyección de Poly I:C se puso una inyección de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, el nucleósido resultante de la unión de la base nitrogenada timina con el anillo de desoxirribosa en la molécula de ADN. Con un marcaje específico por inmunohistoquímica, permite determinar las neuronas que se han originado tras el momento de la inyección, ya que se incorpora en la doble hélice en sustitución de la timina conforme las neuronas replican su material genético en sus procesos de división.

En la siguiente tabla se muestra el momento de las inyecciones tanto de Poly I:C como de BrdU, las dosis de los mismos y el momento del sacrificio de las crías (Tabla 1):

**Tabla 1:** Resumen de los tiempos, dosis y vías de administración de los tratamientos de Poly I:C y PBS a las ratonas gestantes y el momento de sacrificio de sus crías.

INYECCIÓN DE POLY I:C/PBS EN MADRES	INYECCIÓN DE BrdU EN MADRES	SACRIFICIO DE CRÍAS
(10 mg/Kg peso)	(50 mg/Kg peso)	
E13,5 (vena de la cola)	E13,5 (intraperitoneal)	P 22

Se eligió E13,5 como una edad de gestación intermedia para las inyecciones, en base a la información recopilada en los apartados interiores sobre el momento cuando se originan los diferentes tipos neuronales del cuerpo estriado.

## 4. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

### 4.1. Anestesia, fijación del tejido y sacrificio

Tanto los ratones GAD67-GFP como las hembras gestantes del modelo de MIA y posteriormente sus crías, fueron anestesiados profundamente con una solución anestésica compuesta por xilacina, ketamina en solución de cloruro sódico. En todo momento se siguió el protocolo de bienestar animal durante la experimentación.

Posteriormente se llevó a cabo una perfusión intracardiaca con una bomba peristáltica, en la que primero se lavó el circuito con PBS durante dos minutos, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4%, un compuesto fijador tisular, durante siete minutos aproximadamente. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y fueron inmersos en PFA 4% hasta el día siguiente.

### 4.2 Corte del tejido

Los cerebros fueron introducidos en moldes hechos con una solución de agarosa al 4% y se dejaron enfriar a 4°C. A continuación, fueron cortados con el vibratomo LEICA VT100S a un grosor de 60 µm en el plano coronal. Los cortes se colocaron de forma seriada en placas de pocillos con solución de mantenimiento compuesta por PBS con antifúngico azida 0,02%. Se mantuvieron a 4°C a la espera de la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

### 4.3 Anticuerpos

Debido a la presencia del marcador BrdU en el ADN celular, antes de proceder a la incubación tisular con los anticuerpos, los tejidos fueron sumergidos en 1mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N durante 45 minutos a 37°C en agitación para desnaturalizar el material genético y permitir así que el anticuerpo anti-BrdU acceda fácilmente al ADN. Tras ello, el tejido se renaturalizó con una solución de tampón borato 0,1 M a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Posteriormente, los cortes fueron incubados durante 1 hora con una solución de bloqueo para evitar uniones inespecíficas de la membrana celular, compuesta por 5% BSA (proteína albúmina de suero bovino) y 0,5% Triton (detergente), a temperatura ambiente. Tras ello, fueron incubados durante toda la noche en agitación a 4°C con una solución formada por la solución de bloqueo anteriormente descrita y los anticuerpos primarios utilizados para identificar los diferentes marcadores de los tipos neuronales, que fueron:

- Anti- DARPP-32 (hecho en conejo (rabbit, Rb)) a una concentración de 1:500: para el marcaje de las MSNs en los modelos de ratones GAD67-GFP y en experimentos de MIA.

- Anti-DCX (hecho en cabra (goat, Go)) a una concentración de 1:500 en el modelo de GAD67-GFP.
- Anti-GFP (hecho en pollo (chicken, Ch)) a una concentración de 1:1000: las interneuronas del modelo de ratón GAD67-GFP expresa la proteína verde fluorescente (GFP).
- Anti-BrdU (hecho en rata (rat)), a una concentración de 1:500 en experimentos de MIA.
- Anti-Parvalbúmina (PV) (hecho en ratón (mouse, ms)) a una concentración de 1:500: para el marcaje de la interneurona inhibitoria que expresan parvalbúmina en experimentos de MIA.

Posteriormente, las muestras fueron lavadas durante 5 minutos con PBS en agitación e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente, agitación y oscuridad (para no alterar la sensibilidad a la luz de los fluoróforos de los anticuerpos secundarios) con una solución compuesta por la solución de bloqueo y los siguientes anticuerpos secundarios, todos a una concentración de 1:1000 recomendada por el fabricante:

- Donkey anti-rabbit (647): para el anticuerpo primario anti-DARPP-32 en el modelo de ratón GAD67-GFP.
- Donkey anti-goat (555): para el anticuerpo primario anti-DCX en el modelo de ratón GAD67-GFP.
- Donkey anti-chicken (488): para el anticuerpo primario anti-GFP en el modelo de ratón GAD67-GFP.
- Donkey anti-rat (555): para el anticuerpo primario anti-BrdU en los modelos de ratones GAD67-GFP y en experimentos de MIA.
- Donkey anti-rabbit (488): para el anticuerpo primario anti-DARPP-32 en experimentos de MIA.
- Donkey anti-mouse (647): para el anticuerpo primario anti-PV en el modelo de ratón MIA.

Por último, los cortes fueron lavados durante 5 minutos con PBS para eliminar el exceso del anticuerpo secundario e incubados durante 10 minutos en agitación y oscuridad, con una solución compuesta por PBS y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que se intercala entre las regiones ricas en adenina y timina del ADN, tiñendo así los núcleos celulares. Posteriormente, los cortes fueron lavados durante 5 minutos con PBS y se procedió a su montaje.



#### 4.4 Montaje

Los cortes fueron colocados en portaobjetos biselados y se dejaron secar para eliminar el exceso de PBS. Posteriormente se les administró el medio de montaje acuoso Inmumont y se colocaron encima los cubreobjetos.

#### 4.5 Visualización en el microscopio y cuantificación neuronal

Los marcajes inmunohistoquímicos se analizaron en el microscopio Leica Thunder y se tomaron fotografías con el objetivo de 20X. Las imágenes obtenidas del experimento de la MIA, en formato tif, fueron procesadas con el programa FIJI para cuantificar las neuronas doble positivas para BrdU y DARPP-32 y para BrdU y PV en un área determinada en el NAc (mm<sup>2</sup>).

### 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se calcularon las densidades de neuronas DARPP-32<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> relativas a las áreas determinadas del núcleo accumbens (n<sup>o</sup>células/mm<sup>2</sup>) de cada corte (cada individuo tuvo aproximadamente entre 3 y 4 cortes) para luego obtener los datos medios por individuos y por camada.

Con los datos medios por camada, fueron agrupadas según tenían aplicados el tratamiento con Poly I:C o el tratamiento de PBS usado como control y se calcularon los datos medios de los dos grupos. Una vez obtenidos, con el programa estadístico PRISM se realizaron los test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) para determinar si los datos seguían una distribución normal. Posteriormente se empleó el test estadístico *t-Student* para dos grupos (Poly I:C y control) para determinar si existen o no diferencias entre los mismos. Para ello, dependiendo del resultado del test de normalidad, se utilizaron los datos de las medias (si los datos siguieron una distribución normal) o los datos de las medianas (si no siguieron una distribución normal). La hipótesis nula (H<sub>0</sub>) fue la existencia de diferencias significativas entre los grupos de tratamientos, y la alternativa (H<sub>1</sub>), lo contrario.

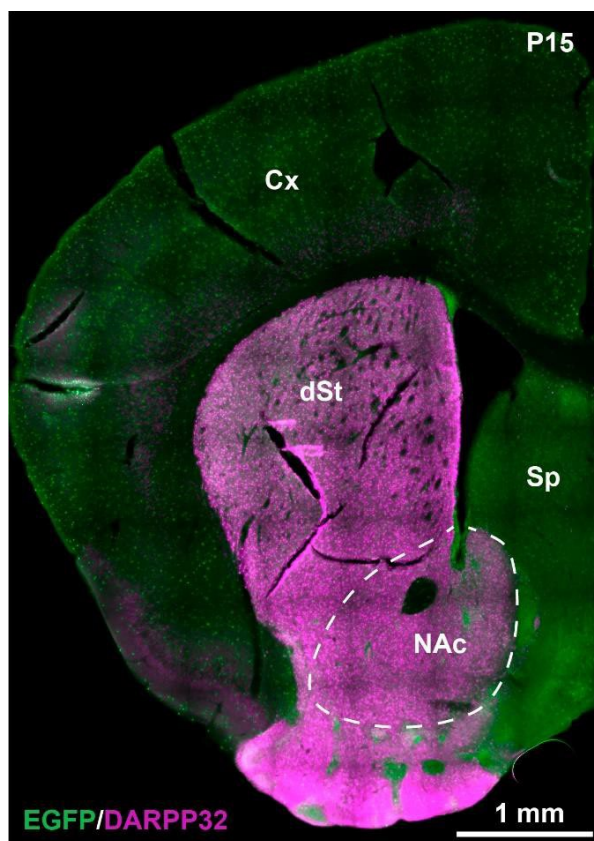
También quisimos estudiar si existen o no diferencias en las densidades neuronales en el Nac a lo largo de su eje rostro-caudal. Para ello, con el mismo programa estadístico, se calcularon los test de normalidad ya citados anteriormente. Posteriormente, se empleó el test estadístico ANOVA para varios grupos y el análisis post-hoc de Kruskal-Wallis.

La hipótesis nula ( $H_0$ ) fue la existencia de diferencias significativas entre los grupos de tratamientos, y la alternativa ( $H_1$ ), lo contrario.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **1. ESTUDIO PREVIO DE LA ANATOMÍA Y ORGANIZACIÓN NEURONAL DEL CUERPO ESTRIADO**

Con el modelo de ratón GAD67-GFP, quisimos estudiar la distribución neuronal y organización anatómica del cuerpo estriado (**Figura 4**). En ella, se pudo observar a las neuronas GABAérgicas marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP). Se distribuyeron por toda la neocorteza (Cx), septum (Sp) y el cuerpo estriado (compuesto por el estriado dorsal (dSt) y el estriado ventral, que contiene al Nac). El cuerpo estriado se identificó también por el marcaje de DARPP-32 (en magenta), una proteína que es regulada por la activación del receptor de dopamina de las neuronas por un tipo de neuronas GABAérgicas, las MSNs. Este se divide en dos regiones, el estriado dorsal, que contiene los estriosomas, del cual deriva el nombre de la misma, y el estriado ventral, el cual contiene al Nac, nuestra área de estudio.

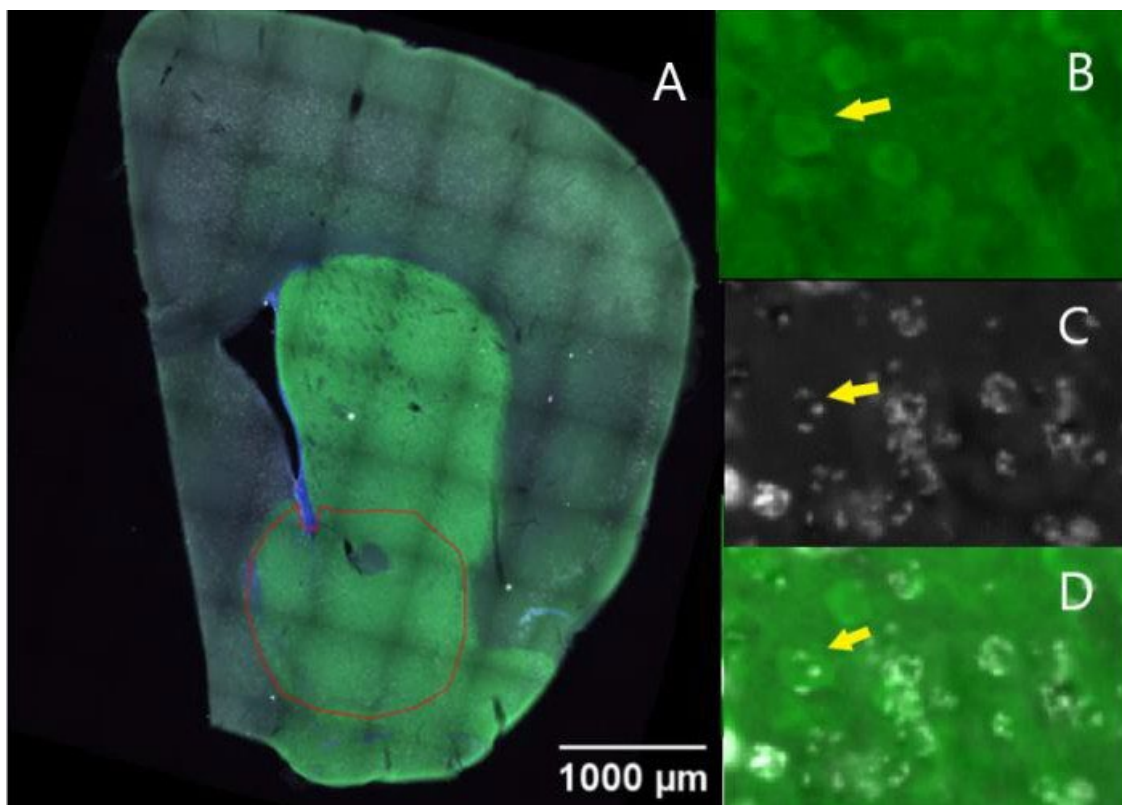


**Figura 4:** Organización anatómica y neuronal del cuerpo estriado de un ratón GAD67-GFP de 15 días postnatal (P15). Cx: neocorteza. dSt: estriado dorsal. Sp: septum. NAc: núcleo accumbens.

## 2. INFLUENCIA DE LA MIA EN LA NEUROGÉNESIS DEL NAc

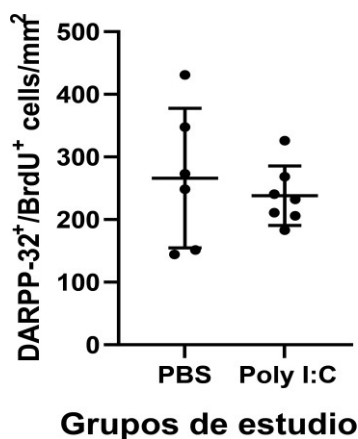
### 2.1 Neurogénesis de las neuronas medianas espinosas de proyección

Se calcularon las medias ponderadas de las densidades celulares de aquellas MSNs que expresaron, al mismo tiempo el marcador para DARPP-32, en verde, y BrdU, en blanco (doble positivas), indicando que dichas MSN se habían originado a E13,5 (**Figura 5**). Quedaron un total de n=8 animales provenientes de las madres sometidas al tratamiento de Poly I:C y n=7 animales procedentes de las madres que fueron tratadas con la solución de control. Hay que aclarar que, para evitar sesgos en la cuantificación y análisis de las muestras, se ha trabajado a ciegas con las muestras, sin saber el tipo de tratamiento al que fueron sometidos los animales. Para llevar a cabo el análisis de los datos, en primer lugar, se aplicaron los test de normalidad y se obtuvo que siguieron una distribución normal.



**Figura 5:** Identificación de MSN. **A** Vista general de un corte coronal del cerebro de un ratón de 22 días postnatal (P22), donde se delimita el Nac (rojo). **B** Neuronas positivas para DARPP-32. **C** Neuronas positivas para BrdU. **D** Neuronas dobles positivas para DARPP-32 y BrdU (flecha amarilla).

Posteriormente, cuando se analizaron los datos obtenidos en las cuantificaciones de células, no se encontraron diferencias en la densidad de neuronas DARPP-32<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> entre el grupo control y el tratado con Poly I:C (t-Student; t=0,6045; p=0,5578>0,05) (**Figura 6**).

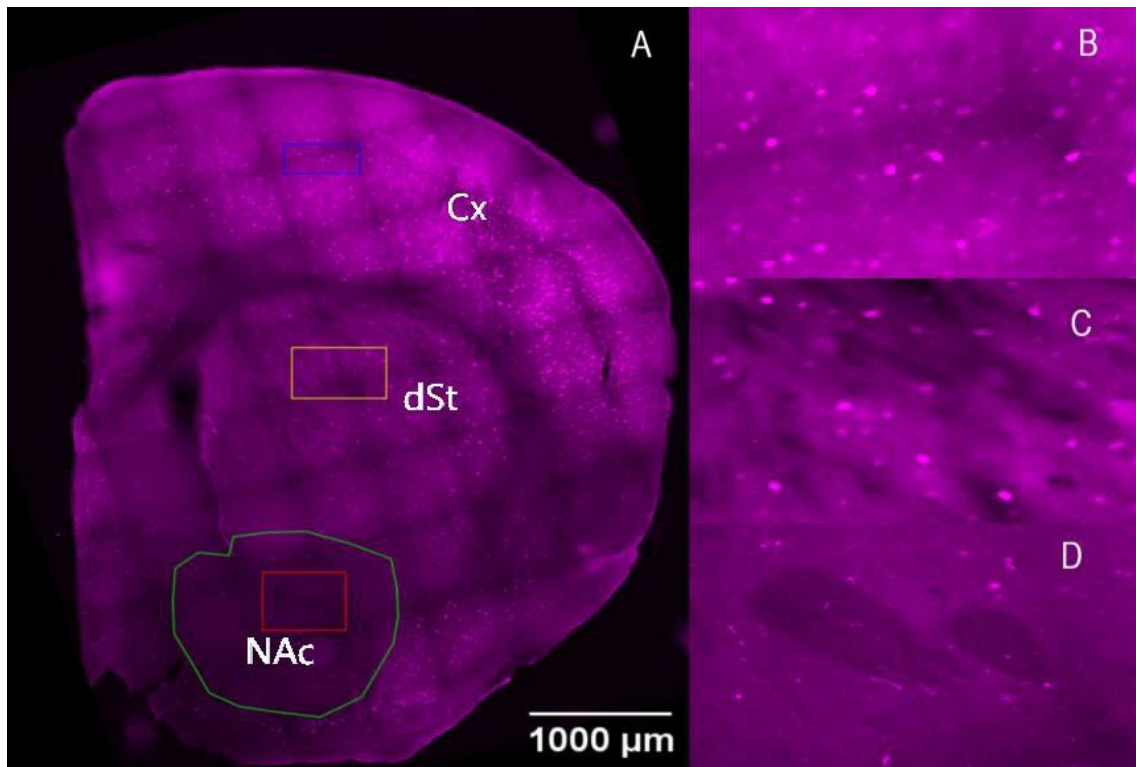


**Figura 6:** Representación de las medias de las densidades de neuronas dobles positivas para DARPP-32 y BrdU en el Nac de un ratón de 22 días postnatal (P22) con respecto a los grupos de tratamiento estudiados (Poly I:C y PBS).

Este resultado puede deberse a varios factores. Primero, hemos de tener en cuenta que se ha analizado un número reducido de muestras que no es lo suficientemente grande para detectar grandes diferencias entre los tratamientos. Segundo, es preciso considerar que se ha estudiado el efecto de la MIA en la población general de MSNs, pero no se ha tenido en cuenta la neurogénesis de las diferentes subpoblaciones de las mismas. Por tanto, podría darse el caso que diferencias en subpoblaciones de MSNs hayan pasado desapercibidas en la cuantificación general de MSNs. Tercero, con respecto a la edad gestacional elegida para administrar el tratamiento, anteriormente se ha comentado que las MSNs tienen tres picos de proliferación en su neurogénesis, que son aproximadamente a E11, E14 y E17. Por último, cabe mencionar la posibilidad de que a esta edad la MIA no tenga efecto alguno, no descartándolo en otras edades gestacionales.

## 2.2 Neurogénesis de las interneuronas que expresan parvalbúmina

Aparte del estudio de las MSN, también quisimos analizar a las interneuronas inhibitorias que expresaban parvalbúmina en el NAc (Figura 7).

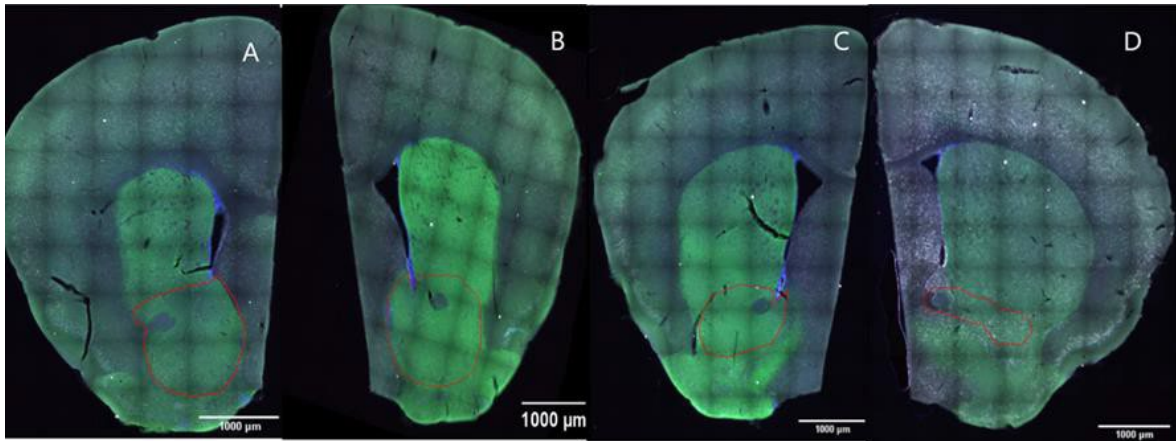


**Figura 7:** Distribución de las interneuronas que expresan parvalbúmina (en magenta) en un corte coronal de un cerebro de ratón de 22 días postnatal (P22). **A** Visión general de un corte coronal del cerebro. Cx: neocorteza. dSt: estriado dorsal. NAc: núcleo accumbens. **B** Ampliación de la corteza. **C** Ampliación del estriado dorsal, donde se observan sus estriosomas (sombas oscuras). **D** Ampliación del NAc, donde se observa la comisura anterior (dos círculos oscuros).

Se detectó la presencia de las interneuronas de PV tanto en la neocorteza (**Figura 7B**) como en el estriado dorsal (**Figura 7C**), pero se detectaron muy pocas en el NAc (**Figura 7D**), por lo que no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico sólido.

### 3. ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN NEURONAL EN EL EJE ROSTRO-CAUDAL

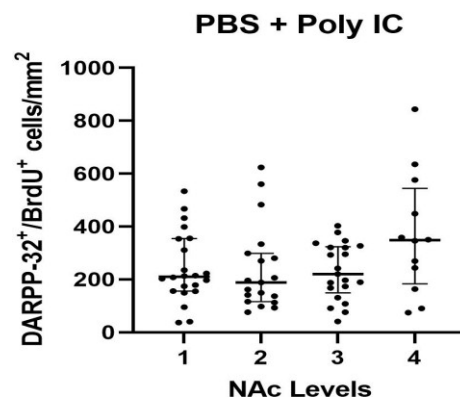
Por último, quisimos estudiar si la distribución neuronal en el NAc era homogénea o no a lo largo del eje rostro-caudal. Para ello, se clasificaron los cortes en niveles del 1 al 4, siendo el 1 el más rostral y el 4, el más caudal, siguiendo el atlas histológico PAXINOS (Paxinos and Franklin, 2001). Los niveles se determinaron en base a las siguientes coordenadas de Bregma: nivel 1: 1,54 mm, nivel 2: 1,18 mm, nivel 3: 0,86 mm y nivel 4: 0,62 mm (**Figura 8**).



**Figura 8:** Niveles de estudio de la densidad neuronal del NAc (rojo) en el eje rostro-caudal en un modelo de ratón de E13.5. Los niveles se han establecido en base a la coordenada de Bregma del atlas histológico PAXINOS. **A** Nivel 1. **B** Nivel 2. **C** Nivel 3. **D** Nivel 4.

En cada nivel se han agrupado los datos de las densidades medias de las distintas réplicas de cada animal, sin hacer distinciones entre el tipo de tratamiento. Esto se debe a que el número de datos de cada nivel separándolos por tratamiento es muy bajo, por lo que no se podría hacer un análisis posterior sólido.

De la misma manera que el estudio anterior, se determinó en primer lugar la normalidad de los datos y se obtuvo que todos los niveles siguieron una distribución normal salvo el 2 (**Figura 8B**). Por ello, se trataron todos los datos como no normales. Posteriormente, tras analizar los datos obtenidos de las medianas de las densidades celulares agrupadas en cada uno de los niveles, no se encontraron diferencias entre ellos (test ANOVA y post-hoc de Kruskal-Wallis;  $H= 4,118$ ;  $p=0,2490 > 0,05$ ) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Representación gráfica de las medianas de las densidades de neuronas dobles positivas para DARPP-32 y BrdU en el NAc de un ratón a E13.5 a lo largo de su eje rostro-caudal, mezclando los dos tratamientos.

En la **Figura 9**, se representan los valores de las medianas de las densidades de MSN dobles positivas para DARPP-32 y BrdU en la región del NAc a lo largo de los cuatro niveles rostro-caudales establecidos. Se observa que son prácticamente iguales en los niveles 1-3 (**Figuras 8A, 8B y 8C respectivamente**) en torno a 200 células DARPP-32<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> / mm<sup>2</sup>. En el nivel 4 (**Figura 8D, Figura 9**), la mediana es ligeramente superior a los otros niveles debido a que se cuantificaron cifras elevadas de neuronas en un área muy pequeña al ser muy caudal, de ahí que los resultados de las densidades hayan sido mayores.

La falta de diferencias en la distribución rostro-caudal de células DARPP-32<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> pudo deberse a varios factores, como fue el análisis de las MSNs a P22, hizo que se dejase un espacio temporal de cuatro semanas desde la edad de la inyección de Poly I:C (E13,5), pudiéndose compensar en él las posibles diferencias que se puedan producir en la distribución de estas neuronas en el propio proceso de neurogénesis. Segundo, al haber estudiado la población general de MSNs, es posible que existan diferencias en la distribución de subpoblaciones de MSNs a lo largo del eje rostro-caudal en el NAc que queden enmascaradas en el número total de neuronas maduras.

A pesar de haber utilizado un modelo animal para realizar este trabajo, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones al respecto, como es el momento del desarrollo de la activación inmunitaria en la gestación, el sexo de las crías, las posibles diferencias en la respuesta inmune entre las madres, la edad de los progenitores, o la dieta, entre otros (Hall et al., 2023). Este modelo también tiene sus limitaciones, como la no producción completa de una respuesta inmunitaria al utilizar compuestos no virulentos, la no influencia de otros factores en el individuo al realizarse el experimento en condiciones controladas, la elección del organismo modelo o la variabilidad en el diseño experimental de los modelos MIA en roedores de diversos factores (Massarali et al., 2022). Todo ello debe tenerse en cuenta de cara a futuras investigaciones con estos modelos en trastornos psiquiátricos.

Por último, las investigaciones científicas sobre el TEA en humanos también tienen sus propias limitaciones, como es la heterogeneidad clínica con la que se manifiesta el trastorno, el diagnóstico diferencial por sexos, sus comorbilidades con otros trastornos psiquiátricos, la exclusión de determinados subgrupos de individuos dentro del espectro autista, la falta de participantes sin TEA en algunos estudios, los diferentes protocolos de adquisición de muestras y los tamaños muestrales pequeños (Langen et al., 2009; Shiohama et al., 2022). Su estudio en modelos animales es complejo, ya que el TEA es un trastorno que se manifiesta en humanos. Debido a que sus características son conductuales, el objetivo de los modelos es

conseguir reproducirlas lo más fielmente posible. Los que suelen presentar un mayor grado de validación a nivel conductual son los que han sido creados en base a las alteraciones genéticas humanas de este trastorno, pero el problema reside en la no consideración de la etiología multifactorial del TEA y en la no existencia de pruebas comportamentales sólidas que sean realmente análogas entre humanos y ratones. Con respecto al estudio en estos modelos de los factores ambientales implicados en el TEA, a pesar de tener un coste económico bajo y reaccionar de manera rápida, sencilla a los fármacos utilizados para este fin, solo manifiestan algunos rasgos de este trastorno (Bey and Jiang, 2014; Li et al., 2021; Silverman et al., 2022). Todo ello debería de tenerse en cuenta de cara a futuras investigaciones neurocientíficas sobre el TEA.

## **V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Las alteraciones que afectan a la neurogénesis, generando trastornos del neurodesarrollo como el TEA, son de origen multifactorial, por lo que su estudio no debe centrarse en una sola variable. La obtención de resultados negativos con respecto a la influencia de la MIA en la neurogénesis de MSN a E13,5 no descarta los posibles efectos que sí pueda tener en otras edades gestacionales y tipos neuronales, en un estudio diferencial por sexos, así como en el análisis de su efecto en los progenitores neuronales. Por ello, estas variables dejan paso a ampliar este estudio con otras líneas de investigación. Por un lado, se puede continuar la línea de estudio postnatal de este trabajo, pero realizando las inyecciones a edades más tempranas, entre E10 y E12, en las cuales tendría más efecto el tratamiento de cara a la neurogénesis. Asimismo, se podrían realizar análisis de comportamiento a las crías de las madres a las que se les aplicaría tanto la inyección de Poly I:C como las del tratamiento de control para verificar si manifiestan patrones de movimientos repetitivos. Por otro lado, cabría ampliar el número de crías para que el análisis por sexos sea más contrastado, pues se ha demostrado que la ratio de diagnóstico diferencial del TEA difiere por sexos. Por último, se puede abrir una nueva línea de trabajo basada en el análisis de los progenitores de las neuronas de nuestro estudio, para verificar si los resultados obtenidos en estos concuerdan con los resultados de los estudios postnatales.

Todas estas posibles vías de investigación podrían dar respuestas al origen neurobiológico de los trastornos psiquiátricos.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA**

- Baj J, Flieger W, Flieger M, Forma A, Sitarz E, Skórzyńska-Dziduszko K, et al. Autism spectrum disorder: Trace elements imbalances and the pathogenesis and severity of autistic symptoms. *Neurosci Biobehav Rev* 2021;129. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.07.029>.
- Baraño RI. Inmunología del embarazo. *Invest Clin* 2011;52. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v43i1019>.
- Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog Neurobiol* 2019;175. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>.
- Bey AL, Jiang Y hui. Overview of mouse models of autism spectrum disorders. *Curr Protoc Pharmacol* 2014;2014. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0566s66>.
- Boulanger-Bertolus J, Pancaro C, Mashour GA. Increasing role of maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Front Behav Neurosci* 2018;12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00230>.
- Brown AS, Meyer U. Maternal immune activation and neuropsychiatric illness: A translational research perspective. *American Journal of Psychiatry* 2018;175. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.17121311>.
- Budday S, Steinmann P, Kuhl E. Physical biology of human brain development. *Front Cell Neurosci* 2015;9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00257>.
- Carlezon WA, Kim W, Missig G, Finger BC, Landino SM, Alexander AJ, et al. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53294-z>.
- Cattaneo S, Zaghi M, Maddalena R, Bedogni F, Sessa A, Taverna S. Somatostatin-Expressing Interneurons Co-Release GABA and Glutamate onto Different Postsynaptic Targets in the Striatum. *BioRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/566984>.
- Cauli B, Zhou X, Tricoire L, Toussay X, Staiger JF. Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons. *Front Neuroanat* 2014;8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00052>.
- Chen L, Chatterjee M, Li JYH. The mouse homeobox gene *Gbx2* is required for the development of cholinergic interneurons in the striatum. *Journal of Neuroscience* 2010;30. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3742-10.2010>.
- Delhaye-Bouchaud N. Développement du système nerveux central chez les mammifères. *Neurophysiologie Clinique* 2001;31. [https://doi.org/10.1016/S0987-7053\(01\)00249-0](https://doi.org/10.1016/S0987-7053(01)00249-0).
- Fuccillo M V. Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. *Front Neurosci* 2016;10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00027>.
- Ganglia B, Revisión B, Ospina-García N, Pérez-Lohman C, Vargas-Jaramillo JD, Cervantes-Arriaga A, et al. Ganglios Basales y Conducta. *Revista Mexicana de Neurociencia* 2017;18.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC. Beyond the dopamine receptor: The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 1999;23. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80798-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80798-9).
- Hall MB, Willis DE, Rodriguez EL, Schwarz JM. Maternal immune activation as an epidemiological risk factor for neurodevelopmental disorders: Considerations of

- timing, severity, individual differences, and sex in human and rodent studies. *Front Neurosci* 2023;17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1135559>.
- Hegarty JP, Lazzeroni LC, Raman MM, Hallmayer JF, Cleveland SC, Wolke ON, et al. Genetic and environmental influences on corticostriatal circuits in twins with autism. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 2020;45. <https://doi.org/10.1503/jpn.190030>.
- HervásA, Maraver N. Trastornos del Neurodesarrollo. Trastornos del espectro autista. *Editorialmédica Panamericana*. 2021; Vol 5.
- Hervás A, Maristany M, SalgadoM, Sánchez Santos L. Los trastornos del espectro autista. *Pediatr Integral*.2012;16(10):780-94.
- Jiang X, Nardelli J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 2016;92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.07.007>.
- Kaminer J, Espinoza D, Bhimani S, Tepper JM, Koos T, Shiflett MW. Loss of striatal tyrosine-hydroxylase interneurons impairs instrumental goal-directed behavior. *European Journal of Neuroscience* 2019;50. <https://doi.org/10.1111/ejn.14412>.
- Knowles R, Dehorter N, Ellender T. From progenitors to progeny: Shaping striatal circuit development and function. *Journal of Neuroscience* 2021;34. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0620-21.2021>.
- Langen M, Schnack HG, Nederveen H, Bos D, Lahuis BE, de Jonge M V., et al. Changes in the Developmental Trajectories of Striatum in Autism. *Biol Psychiatry* 2009;66. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.03.017>.
- Li W, Pozzo-Miller L. Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. *J Neurosci Res* 2020;98. <https://doi.org/10.1002/jnr.24560>.
- Li Z, Zhu YX, Gu LJ, Cheng Y. Understanding autism spectrum disorders with animal models: Applications, insights, and perspectives. *Zool Res* 2021;42. <https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2021.251>.
- Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 2018;100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009>.
- Massarali A, Adhya D, Srivastava DP, Baron-Cohen S, Kotter MR. Virus-Induced Maternal Immune Activation as an Environmental Factor in the Etiology of Autism and Schizophrenia. *Front Neurosci* 2022;16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.834058>.
- Matsushima A, Graybiel AM. Combinatorial Developmental Controls on Striatonigral Circuits. *Cell Rep* 2020;31. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107778>.
- McLellan J, Kim DHJ, Bruce M, Ramirez-Celis A, Van de Water J. Maternal Immune Dysregulation and Autism—Understanding the Role of Cytokines, Chemokines and Autoantibodies. *Front Psychiatry* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.834910>.
- Mi D, Li Z, Lim L, Li M, Moissidis M, Yang Y, et al. Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science (1979)* 2018;360. <https://doi.org/10.1126/science.aar6821>.
- Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF, et al. New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat* 2019;235. <https://doi.org/10.1111/joa.13055>.
- Morris-Rosendahl DJ, Crocq MA. Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues Clin Neurosci* 2020;22. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.1/macrocq>.
- Nahar L, Delacroix BM, Nam HW. The Role of Parvalbumin Interneurons in Neurotransmitter Balance and Neurological Disease. *Front Psychiatry* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.679960>.

- Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med* 2011;17. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001>.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edition. Academic Press 2001.
- Van Rooij D, Anagnostou E, Arango C, Auzias G, Behrmann M, Busatto GF, et al. Cortical and subcortical brain morphometry differences between patients with autism spectrum disorder and healthy individuals across the lifespan: Results from the ENIGMA ASD working group. *American Journal of Psychiatry* 2018;175. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17010100>.
- Shiohama T, Ortug A, Warren JLA, Valli B, Levman J, Faja SK, et al. Small Nucleus Accumbens and Large Cerebral Ventricles in Infants and Toddlers Prior to Receiving Diagnoses of Autism Spectrum Disorder. *Cerebral Cortex* 2022;32. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab283>.
- Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron* 2016;89. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>.
- Silverman JL, Thurm A, Ethridge SB, Soller MM, Petkova SP, Abel T, et al. Reconsidering animal models used to study autism spectrum disorder: Current state and optimizing future. *Genes Brain Behav* 2022;21. <https://doi.org/10.1111/gbb.12803>.
- Thabault M, Turpin V, Maisterrena A, Jaber M, Egloff M, Galvan L. Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: From Clinical Observations to Animal Models. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23042294>.
- Vasistha NA, Khodosevich K. The impact of (ab)normal maternal environment on cortical development. *Prog Neurobiol* 2021;202. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102054>.
- Yang HKC, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Szele FG. Distribution of Doublecortin Expressing Cells Near the Lateral Ventricles in the Adult Mouse Brain. *J Neurosci Res* 2004;76. <https://doi.org/10.1002/jnr.20071>.
- Zawadzka A, Cieřlik M, Adamczyk A. The role of maternal immune activation in the pathogenesis of autism: A review of the evidence, proposed mechanisms and implications for treatment. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms222111516>.

## WEBGRAFÍA

- página web CDC prevalencia TEA: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/autism/addm-community-report/arkansas.html#:~:text=En%20el%202018%2C%20el%20AR,8%20a%C3%B1os%20en%20el%202018>
- página web de la OMS prevalencia TEA: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>