

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VIVIANA CAROLINA TRUJILLO ROJAS

ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE OXITOCINA EN UN MODELO DE AUTISMO
INDUCIDO POR ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA CON LIPOPOLISACÁRIDO
DURANTE LA GESTACIÓN

ALFENAS/MG

2019

VIVIANA CAROLINA TRUJILLO ROJAS

**ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE OXITOCINA EN UN MODELO DE AUTISMO
INDUCIDO POR ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA CON LIPOPOLISACÁRIDO
DURANTE LA GESTACIÓN**

Disertación presentada como requisito para la obtención de título de Mestre em Ciências Fisiológicas por el Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas de la Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentración: Neuroinmunoendocrinología.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

ALFENAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

R741a Rojas, Viviana Carolina Trujillo.
Administração intranasal de oxitocina em un modelo de autismo inducido por activación inmune materna com lipopolisacárido durante la gestación. / Viviana Carolina Trujillo Rojas - Alfenas/MG, 2019.
63 f.: il. --

Orientador: Alexandre Giusti Paiva
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Transtorno del Espectro Autista. 2. Inmunidad. 3. Lipopolisacáridos. 4. Oxitocina. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD-612.82

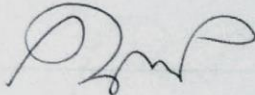
VIVIANA CAROLINA TRUJILLO ROJAS

"ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE OXITOCINA EN UN MODELO DE AUTISMO
INDUCIDO POR ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA COM LIPOPOLISACÁRIDO DURANTE
LA GESTACIÓN"

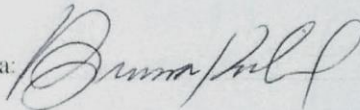
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de
Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Aprovado em: 30/1/19

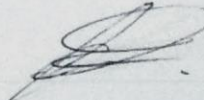
Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Bruna Kalil
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Bruno Zavan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

A mis padres y a todas las personas
que han hecho parte de este proceso...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mis padres, que han sido mi mayor apoyo en todos los momentos de la vida y que, incluso en la distancia siguen ahí para ayudarme, reconfortarme y motivarme siempre. A mis bebés peludos Kenia y a Pancho por ser un motor en mi vida, por motivarme a seguir creciendo, soñando y aprendiendo.

A mis amigos en Colombia que se convirtieron (como el cliché) en mi familia escogida, quienes me han ayudado a sobrellevar las dificultades de este proceso y han acompañado también todas las alegrías y logros, que me han sacado sonrisas (y carcajadas) en momentos difíciles. A Roberto por todo el amor, atención y cuidado que da a mis bebés, que me ayuda a sentirme más tranquila estando lejos de ellos.

Hago un reconocimiento especial a César y a Cristian, mis hermanos del alma, sin los cuales tal vez habría muerto de inanición. Agradezco infinitamente su apoyo incondicional, las conversaciones profundas, los abrazos y todo el cuidado que me han dado.

A Emanuel, por ser ese gran compañero que es, por todos los momentos compartidos y por hacerme parte de su familia.

A mi orientador Alexandre Giusti-Paiva por haberme recibido en el laboratorio, por compartir su conocimiento y por su paciencia conmigo. A Fabi y todos los demás compañeros del laboratorio por recibirme tan bien y por hacer un ambiente agradable en todos los momentos. Especialmente agradezco a Fernando y a Wesley por su infinita paciencia al enseñarme portugués, los procedimientos del laboratorio, y explicarme mil veces lo mismo. A todos los admiro por su dedicación y su conocimiento.

A Cindy y Alexandra que, junto conmigo hacen o hicieron parte de este proceso de salir de casa para crecer y que me enseñan cosas todos los días.

A la Universidade Federal de Alfenas y el programa de becas PAEC OEA-GCUB por darme esta gran oportunidad de crecimiento.

Y finalmente pero no menos importante; agradezco a la vida por darme oportunidades tan generosas, por colocar personas increíbles en mi camino, y por darme la oportunidad de aprender a cada paso que doy.

RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA) es un desorden del neurodesarrollo, que se caracteriza por generar déficits en la comunicación verbal y no verbal, deficiencias en la interacción social en diversos contextos, y patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento e intereses. Se cree que el neuropéptido hipotalámico oxitocina (OT) puede generar mejoras en algunas características del TEA. La OT ha sido ampliamente estudiada en su relación con comportamientos sociales complejos, además de su participación en comportamientos de unión y de afiliación social en algunas especies. El propósito del presente trabajo fue evaluar los efectos comportamentales de la administración de OT de forma intranasal (i.n.) en un modelo de TEA inducido por lipopolisacárido (LPS). Ratas wistar hembras adultas fueron tratadas con LPS i.p. (500 µg/kg) durante el día 16 de gestación; las crías macho fueron tratadas con OT i.n. (20 µg/animal) en una única dosis 10 minutos antes de cada experimento y pasaron por tests comportamentales de vocalizaciones ultrasónicas (USV's), *homing*, *hole-board*, campo abierto y comportamiento de juego durante la adolescencia. La administración de LPS durante el periodo prenatal únicamente generó hipolocomoción y aumento en el tiempo de *grooming*. En los animales del grupo LPS se observó menor expresión del receptor de OT en la corteza prefrontal. Con respecto a la administración i.n. de OT, se generó un aumento en el número de USV's y disminución en el tiempo de latencia en el test de *homing* tanto en el grupo control como en el grupo LPS. Los resultados obtenidos en las crías mostraron que la administración de LPS durante el periodo prenatal no fue capaz de alterar completamente el comportamiento de los animales y, además, hubo divergencias respecto a estudios previos. Sin embargo, la OT de forma i.n., fue capaz de mejorar algunos parámetros sociales.

Palabras clave: Trastorno del espectro autista. Activación inmune materna. Lipopolisacárido. Oxitocina.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder, characterized by impairments in verbal and nonverbal communication, deficiencies in social interaction in various contexts, and restrictive and repetitive patterns of behavior and interests. It is believed that the hypothalamic neuropeptide oxytocin (OT) can generate improvements in some of the features of ASD. OT has been widely studied in its relationship with complex social behaviors, in addition to its participation in pair bonding and social affiliation behaviors in some species. The purpose of this study was to evaluate the behavioral effects of intranasally administered (i.n.) OT in a model of ASD induced by lipopolysaccharide (LPS). Female wistar rats were treated with i.p. LPS (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) during gestation day 16; the male pups were treated with i.n. OT (20 $\mu\text{g}/\text{animal}$) in a single dose 10 minutes before each experiment, and then passed through behavioral tests of ultrasonic vocalizations (USV's), homing, hole-board, open field and play behavior during adolescence. LPS administration during the prenatal period generated hypolocomotive behavior, and an increase in the time of grooming. In the LPS group, lower expression of the OT receptor (OTR) was observed in the prefrontal cortex. Regarding of i.n. administration of OT, there was an increase in the number of USV's and a decrease in the latency time in the nest seeking behavior test in both the control group and the LPS group. The results obtained in this study showed that the administration of LPS during the prenatal period was not able to completely alter the behavior of the animals and, in addition, there were divergences with respect to previous studies. However, the OT in an i.n. way was able to improve some social parameters.

Keywords: Autism spectrum disorder. Maternal immune activation. Lipopolysaccharide. Oxytocin.

RESUMO

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento, caracterizado por prejuízos na comunicação verbal e não verbal, deficiências na interação social em vários contextos e padrões restritivos e repetitivos de comportamento e interesses. Acredita-se que o neuropeptídeo hipotalâmico ocitocina (OT) possa gerar melhorias em algumas das características do TEA. A OT tem sido amplamente estudado em sua relação com comportamentos sociais complexos, além de sua participação no pareamento e comportamentos de afiliação social em algumas espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos comportamentais da OT administrada por via intranasal (i.n.) num modelo de ASD induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Ratas wistar fêmeas foram tratadas com LPS i.p. (500 µg/kg) durante o 16º dia de gestação; os filhotes macho foram tratados com OT i.n. (20 µg/animal) em uma única dose 10 minutos antes de cada experimento e passaram por testes comportamentais de vocalizações ultrassônicas (USV's), *homing*, *hole-board*, campo aberto e comportamento de brincar. A administração de LPS durante o período pré-natal gerou um comportamento hipolocomotivo e um aumento no tempo de *grooming*. No grupo LPS, foi observada menor expressão do receptor OT (OTR) no córtex pré-frontal. Em relação à administração de OT i.n., houve um aumento no número de USV's e uma diminuição no tempo de latência no teste de comportamento de *homing*, tanto no grupo controle quanto no grupo LPS. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a administração de LPS durante o período pré-natal não foi capaz de alterar completamente o comportamento dos animais e, aliás, houve divergências em relação a estudos anteriores. No entanto, a OT por via i.n. foi capaz de melhorar alguns parâmetros sociais.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. Ativação imune materna. Lipopolissacarídeo. Ocitocina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pruebas experimentales realizadas a los animales de cada camada del grupo control y del LPS.....	25
Figura 2 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% (control) en el campo abierto en el día dieciséis de gestación (GD16).....	32
Figura 3 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% en el GD16 sobre el número medio de crías nacidas vivas por camada.....	33
Figura 4 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% en el GD16 sobre el peso medio de las crías nacidas vivas por camada.....	34
Figura 5 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% en el GD16 sobre la curva de crecimiento de las crías.....	35
Figura 6 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en el número de vocalizaciones ultrasónicas para los animales del grupo control y LPS.....	36
Figura 7 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina (OT) en el desempeño en el test de homing para los animales control o LPS.....	37
Figura 8 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en el número de inmersiones en el test de hole board para los animales del grupo control y LPS.....	39
Figura 9 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en la distancia recorrida y tiempo de inmovilidad en el test de campo abierto para los animales del grupo control y LPS.....	40
Figura 10 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en la frecuencia y tiempo de grooming durante el test de campo abierto para los animales control y LPS.....	41
Figura 11 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en los parámetros evaluados durante el comportamiento de juego para los animales control y LPS.....	42
Figura 12 - Expresión de OTR en la corteza prefrontal de encéfalos de animales control y LPS.....	44

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	11
2	MARCO TEÓRICO	13
2.1	AUTISMO	13
2.2	MODELOS EXPERIMENTALES	15
2.3	ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA Y LPS	16
2.4	OXITOCINA	19
3	JUSTIFICACIÓN	21
4	OBJETIVOS	22
4.1	OBJETIVO GENERAL	22
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5	MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1	ANIMALES	23
5.2	REPRODUCCIÓN	23
5.3	DROGAS UTILIZADAS	23
5.4	ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN: MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO	24
5.5	GRUPOS EXPERIMENTALES	24
5.6	OXITOCINA INTRANASAL	25
5.7	PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS RATAS GESTANTES: COMPORTAMIENTO DE ENFERMEDAD	26
5.7.1	Campo abierto	26
5.7.2	Ingestión de alimento y ganancia de peso	26
5.8	PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS CRÍAS	27
5.8.1	Vocalizaciones ultrasónicas (USV)	27
5.8.2	Comportamiento de homing	28
5.8.3	Tabla de orificios (Hole-board)	28
5.8.4	Campo abierto	29
5.8.5	Comportamiento de grooming	29
5.8.6	Comportamiento de juego (Play behavior)	29

5.9	SACRIFICIO	30
5.10	WESTERN BLOT	30
5.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
6	RESULTADOS	32
6.1	PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS RATAS GESTANTES	32
6.1.1	Comportamiento de enfermedad.....	32
6.2	PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS CRÍAS	36
6.2.1	Vocalizaciones ultrasónicas.....	36
6.2.2	Homing	37
6.2.3	Tabla de orificios (Hole-board)	38
6.2.4	Campo abierto.....	39
6.2.5	Comportamiento de grooming.....	40
6.2.6	Comportamiento de juego.....	41
6.2.7	Western blot.....	43
7	DISCUSIÓN	45
7.1	COMPORTAMIENTO DE ENFERMEDAD EN LAS HEMBRAS GESTANTES	45
7.2	COMPORTAMIENTO DE LAS CRÍAS	47
8	CONCLUSIONES	55
	REFERENCIAS	56

1 INTRODUCCIÓN

El trastorno del espectro autista (TEA), es un desorden complejo del neurodesarrollo, que se caracteriza por déficits en la comunicación verbal y no verbal, deficiencias en la interacción social en diversos contextos, patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento e intereses, además de anormalidades sensoriales. Los efectos y la severidad de los síntomas varían de acuerdo a cada individuo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2018; ASHWOOD, 2006).

Según la Sociedad Americana de Psiquiatría, actualmente, el TEA es diagnosticado durante la infancia, y se hace evidente durante los primeros 3 años de vida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2018; ASHWOOD, 2006). Se estima una prevalencia de cerca de 1,5% en países desarrollados; alrededor de 1 en 36 niños en Estados Unidos y es más común en hombres que en mujeres, siendo la prevalencia en hombres de 4 a 5 veces mayor (LORD ET AL., 2018; SHARMA et al., 2018; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2018; ANOMAL et al., 2015; WÖHR, 2014).

La etiología exacta del autismo y el TEA es actualmente desconocida, sin embargo, se ha demostrado que es el resultado de una combinación entre factores ambientales, inmunológicos, neurológicos y genéticos. La variabilidad de factores etiológicos es lo que lo lleva a tener manifestaciones heterogéneas, lo que dificulta su diagnóstico (ANOMAL et al., 2015; ASHWOOD, 2006).

En la última década, se han encontrado evidencias que asocian la presentación de TEA con una respuesta inmune anormal o no regulada. La exposición de una madre gestante a infecciones bacterianas o virales durante el primer y segundo trimestre de la gestación promueve la activación inmune materna y aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades neuropsiquiátricas en un 13%. Se han establecido entonces diversas líneas de investigación involucrando activación inmune materna durante la gestación (SHARMA et al., 2018; ASHWOOD, 2006).

Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar si la aplicación intranasal del neuropéptido oxitocina, el cual es bien conocido por contribuir a comportamientos de unión y de afiliación social en algunas especies (ANOMAL et al., 2015), es capaz de revertir los efectos en las crías de la activación inmune materna inducida por lipopolisacárido durante el decimosexto día de gestación, que ha sido utilizado como un modelo de autismo.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 AUTISMO

El autismo fue descrito inicialmente por el psiquiatra suizo Eugen Bleuler en 1908. La palabra “Autismo” está derivada del griego “*autós*”, que quiere decir “sí mismo” y utilizó este término para describir cuando los pacientes esquizofrénicos perdían la noción de la realidad. Después, en 1943, Leo Kanner redefinió el término, usándolo en pacientes jóvenes sin esquizofrenia (u otros trastornos psiquiátricos conocidos) para describir los síntomas de aislamiento social y trastornos lingüísticos (SHARMA et al., 2018). A través de los años, el TEA ha sido ampliamente estudiado y su descripción y criterios de diagnóstico han estado en constante cambio (LORD et al., 2018; SHARMA et al., 2018). Actualmente, el TEA es reconocido como un desorden del desarrollo pre y post natal (DICICCO-BLOOM et al., 2006).

Existen tres características principales que definen comportamientos del trastorno: déficits en la comunicación verbal y no verbal, déficits de socialización y comportamientos restrictivos y repetitivos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2018). El diagnóstico se basa en una serie de alteraciones comportamentales contenidas dentro de estos tres grandes grupos, sin embargo, existe variación entre la severidad de los síntomas de los pacientes diagnosticados, lo que ha dificultado la diferenciación de los múltiples trastornos dentro del espectro (SHARMA et al., 2018).

Usualmente, los signos clínicos son evidentes a los 3 años de edad, no obstante, el desarrollo del lenguaje puede atrasar el diagnóstico. Estudios han demostrado que deficiencias en la capacidad de respuesta social, comunicación y juego pueden identificarse en personas de 6 a 12 meses de edad (LEVY et al., 2009).

Actualmente, el diagnóstico se basa en características básicas en dos áreas: comunicación social, y conductas sensoriales y motoras repetitivas y restrictivas, independientemente de factores étnicos, raciales, culturales y socioeconómicos (LORD et al., 2018).

Dentro del TEA se abarca el trastorno autista, el síndrome de Asperger y el trastorno generalizado del desarrollo, no especificado de otro modo (PDD-NOS por sus siglas en inglés) (LANDRIGAN, 2010).

Se han identificado factores de riesgo asociados a la presentación de TEA, dentro de los cuales se han estudiado factores prenatales y perinatales como edad avanzada de los padres, condiciones metabólicas en la madre, uso de algunos medicamentos durante la gestación, nacimientos prematuros, entre otros, así como factores genéticos, pues se ha reportado que el riesgo de TEA es de 74% a 93% heredable (LORD et al., 2018).

La genética juega un papel importante en la presentación del trastorno. Mutaciones genéticas, variantes del número de copias, supresiones de genes y otras anomalías genéticas se han encontrado relacionadas a autismo (LANDRIGAN, 2010; LORD et al., 2018).

Factores ambientales también han sido ampliamente estudiados, como exposición a tóxicos, medicamentos e infecciones durante el primer y segundo trimestre de gestación (LANDRIGAN, 2010).

El TEA resulta de alteraciones tempranas en el desarrollo cerebral y reorganización neural, afecta las áreas centrales de la función cognitiva y adaptativa, la comunicación y las interacciones sociales (LORD et al., 2018; SPERDIN et al., 2018). Estudios de neuroimagen en pacientes autistas han mostrado que hay un crecimiento excesivo de la sustancia blanca cortical y patrones anormales de crecimiento en el lóbulo frontal, los lóbulos temporales y las estructuras límbicas como la amígdala; regiones cerebrales conocidas por su papel en el desarrollo de actividades sociales, comunicativas y motoras (LEVY et al., 2009). Otros estudios sugieren alteraciones en las redes cerebrales asociadas a respuestas de comunicación no verbal en niños autistas (SPERDIN et al., 2018).

2.2 MODELOS EXPERIMENTALES

Los modelos animales de enfermedades neuropsiquiátricas deben incorporar semejanzas con los síntomas en humanos (*face validity*); semejanzas con las causas subyacentes de la enfermedad (*construct validity*); y respuestas esperadas a tratamientos que son efectivos en humanos (*predictive validity*). Los modelos de *construct validity* ayudan para evaluar hipótesis sobre las causas genéticas y ambientales del autismo; por otro lado, los fenotipos con *face validity* proporcionan herramientas translacionales ideales para descubrir tratamientos basados en evidencia (SILVERMAN et al., 2010; CRAWLEY, 2007).

Dadas algunas limitaciones para el estudio de la fisiología y biología molecular del cerebro humano, no se puede pensar en progresos en el estudio de fisiopatología o terapéutica sin buenos modelos animales. Desafortunadamente, los modelos actuales de enfermedades neuropsiquiátricas presentan grandes limitaciones como una validación débil, hasta un poder predictivo deficiente para la eficacia del fármaco en enfermedades humanas (NESTLER; HYMAN, 2010).

El TEA está compuesto por un conjunto de anomalías conductuales diversas y no biomarcadores específicos, además de tener diferentes causas y patogénesis, lo que dificulta la creación de modelos animales (PATTERSON, 2011; NESTLER; HYMAN, 2010; CHADMAN, 2017). Sin embargo, los comportamientos de ratas y ratones se pueden evaluar dentro de los tres parámetros centrales que identifican el autismo; deficiencias en la interacción social, deficiencias en la comunicación, y conductas motoras repetitivas o estereotipadas, así como en comportamientos de interés restrictivo (PATTERSON, 2011). El uso de modelos animales de TEA es un desafío, pues en algunos casos no es posible replicar completamente los comportamientos centrales del desorden.

Se han establecido una serie de modelos animales, los cuales proveen información clave para probar la hipótesis de causalidad entre la activación inmune materna y el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos, así como son una excelente herramienta para explorar los factores de desarrollo y neuroinmunológicos asociados a aumentar la vulnerabilidad a presentar trastornos del

neurodesarrollo inducido por infecciones (MEYER et al., 2009), pues permiten la manipulación del entorno, de factores genéticos, entre otras variables experimentales, así como el uso de técnicas que de otra forma no sería posible realizar en humanos por cuestiones éticas (CHADMAN, 2017).

Hasta el momento existen diversos modelos de autismo en ratas y ratones, incluyendo modelos genéticos y de factores de riesgo ambientales como las infecciones durante la gestación (PATTERSON, 2011). En los modelos de activación inmune materna se ha buscado mimetizar los efectos de infecciones tanto virales como bacterianas mediante la administración intraperitoneal, intravenosa o subcutánea de lipopolisacárido (LPS) o PolyI:C; o virus de influenza por vía intranasal (BOKSA, 2010).

2.3 ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA Y LPS

Durante la gestación, el sistema inmune de la madre sufre adaptaciones para proteger el organismo materno y fetal ante un desafío inmune; la modulación del sistema inmune conduce a diferentes respuestas dependiendo de la etapa del embarazo (RACICOT et al, 2014; MOR; CÁRDENAS, 2010). De manera que, a diferencia de la vieja concepción del embarazo es un estado de inmunosupresión, durante este proceso el sistema inmune está activo, funcional y regulado (MOR et al, 2017; MOR; CÁRDENAS, 2010). De hecho, el sistema inmunológico materno debe tener la capacidad de responder apropiadamente ante un desafío inmunológico para lograr una gestación exitosa. De la misma forma, es importante comprender que la unidad fetal-placentaria también tiene un sistema inmunológico en desarrollo que es capaz de modificar aún más la respuesta inmune materna, así como la forma que el sistema inmune reacciona a las condiciones ambientales (MOR et al., 2017).

El sistema inmune desempeña un papel fundamental durante las diferentes etapas de la gestación. La gestación comienza con un ambiente proinflamatorio, que permite la implantación del embrión y la formación de la placenta, y es mediado por células inmunes, citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión (VAN MOURIK et al., 2008).

Una vez el embrión es implantado, sigue una etapa de crecimiento y desarrollo rápidos en el feto, caracterizada por un ambiente antiinflamatorio en la madre. Esta etapa inmunológica es mediada por macrófagos placentarios, células *Natural killer* (NK) y células T regulatorias. Los

macrófagos de la placenta están asociados a la renovación celular y el reparo de los tejidos, un papel importante para evitar generar una respuesta inmune que pueda afectar el feto (MOR et al., 2017; RACICOT et al., 2014). Por otro lado, las células NK tienen un papel en el desarrollo y mantenimiento de la placenta. Generalmente, cuando los macrófagos y las células NK son activados en los tejidos y la circulación, tienen efectos citotóxicos, sin embargo, las alteraciones generadas por los factores regulatorios secretados por la placenta hacen que estas células mantengan un perfil “progestacional” para mantener el crecimiento del feto (RACICOT et al., 2014). Durante la gestación, las células T regulatorias ayudan también a mantener el ambiente antiinflamatorio, previniendo respuestas inmunes contra antígenos paternos y evitando el rechazo por parte del sistema inmune materno (LA ROCCA et al., 2014; ROWE et al., 2012).

Cuando el feto completa el desarrollo, y durante el último período inmunológico de la gestación, es necesario generar un nuevo ambiente de inflamación para desencadenar el parto. El período final de la gestación se caracteriza por la entrada de células del sistema inmune al miometrio, con el fin de promover las contracciones uterinas, la expulsión del bebé y de la placenta (MOR; CÁRDENAS, 2010).

Se ha sugerido que las citoquinas tienen un papel fundamental en el desarrollo normal del cerebro del feto y se sabe que son las responsables de inducir el neuroepitelio, así como de la regulación de la renovación de las células de glia; también tienen un papel en la regulación de la migración neuronal y modulan la localización de los trayectos de los axones, además de tener un papel en la modulación de la vascularización, en la supervivencia neuronal y en la formación y función de sinapsis (RATNAYAKE et al., 2013; DEVERMAN; PATTERSON, 2009).

Se cree también que las células de microglía tienen un papel en el desarrollo y la maduración normal del cerebro, incluyendo el refinamiento de circuitos neurales, la inducción de la muerte celular programada, regulación del tracto axonal, posicionamiento de las interneuronas migrantes (INs), regulación de la neurogénesis y también, se ha propuesto su función en la gliogénesis, así como la angiogénesis (THION; GAREL, 2017).

Sabiendo que los componentes celulares y moleculares del sistema inmune tienen funciones relevantes en el neurodesarrollo normal, el supuesto es que la activación anormal de estos

componentes puede conducir a una variedad de disturbios del sistema nervioso central (SOLEK et al., 2018).

La activación inmune materna es considerada un factor de riesgo para trastornos del neurodesarrollo del feto (MEYER et al., 2009). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que infecciones durante el periodo prenatal pueden llevar a un riesgo mayor de desenvolver trastornos del neurodesarrollo asociadas a autismo y esquizofrenia (KNUESEL et al., 2014; PATTERSON, 2011).

Como es bien sabido, el sistema inmunológico tiene efectos a nivel neurológico; productos de la activación inmune como citoquinas neuro inflamatorias pueden intervenir en vías neurológicas, por lo tanto, una respuesta inmune alterada durante los períodos críticos del desarrollo neurológico y cerebral podría desempeñar un papel importante en la disfunción neurológica típica del autismo (SHARMA et al., 2018; ASHWOOD, 2006).

Las citoquinas proinflamatorias envueltas en esta respuesta son la IL-6, $TNF\alpha$, e IL-1. La IL-6 circulante interactúa en el cerebro induciendo síntesis de prostaglandinas en el hipotálamo, las cuales son las responsables de generar alteraciones de temperatura; también la IL-6 se conoce como la responsable de los cambios en las crías, pues se han encontrado niveles aumentados en el suero, así como en el líquido amniótico, placenta y cerebro del feto (KNUESEL et al., 2014; BOKSA, 2010). Investigaciones han mostrado que los periodos medio y tardío de la gestación tanto en ratas como en ratones corresponden a ventanas de vulnerabilidad a respuestas fetales agudas a citoquinas, así como comportamientos disfuncionales más adelante en el desarrollo (KNUESEL et al., 2014).

El LPS ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la activación inmune materna y ha mostrado tener efectos al manifestar comportamiento de enfermedad. La administración de LPS durante la gestación puede conllevar a que la prole manifieste comportamientos característicos de autismo; algunos de los cuales podrían ser revertidos con drogas antipsicóticas. La patología en los modelos con LPS varía de acuerdo con el protocolo de tratamiento utilizado (PATTERSON, 2011).

2.4 OXITOCINA

La manipulación farmacológica y genética de oxitocina (OT) y arginina vasopresina (AVP) han mostrado la importancia de estos péptidos en el comportamiento social y comportamientos repetitivos (PATTERSON, 2011).

La OT es un neuropéptido hipotalámico que contribuye a comportamientos de unión y de afiliación social en algunas especies (ANOMAL et al., 2015). Es bien conocido por sus efectos periféricos en la fisiología reproductiva, específicamente contracciones uterinas durante el parto y expulsión de leche durante la lactancia (DUCHEMIN et al., 2017). La OT y algunos de sus análogos tienen efectos centrales y contribuyen a la regulación de comportamientos sociales complejos (NAGASAWA et al., 2012; ANOMAL et al., 2015; PATTERSON, 2011; DUCHEMIN et al., 2017).

La OT es producida principalmente en el núcleo paraventricular y supraóptico del hipotálamo y es secretada principalmente por la hipófisis; sus efectos están mediados por su unión al receptor de OT (OTR). El OTR contiene siete dominios transmembrana y pertenece a la clase 1 de la familia de receptores acoplados a la proteína G. En respuesta a la unión del ligando, OTR conduce a la estimulación de fosfolipasa C. Los OTR se expresan principalmente en el tracto reproductivo, cerebro, y riñones en mamíferos, sugiriendo que la señalización a través del OTR podría desencadenar una gran variedad de efectos (TAKAYANAGI et al., 2005).

En el cerebro, los OTR se expresan en regiones neuronales relacionadas con el comportamiento social, la unión de parejas, la memoria social y la agresión social en mamíferos no humanos (LOPARO; WALDMAN, 2015).

En individuos autistas se han encontrado niveles reducidos de OT en el plasma, además de disminución del ARNm del OTR en la corteza temporal en muestras post-mortem (PARKER et al., 2017; PARKER et al., 2014; PATTERSON, 2011). En contraste, se ha encontrado que la infusión de OT intranasal reduce el comportamiento estereotipado y mejora el contacto visual y la memoria social en pacientes con autismo (PATTERSON, 2011). Neuropéptidos como oxitocina y

arginina vasopresina, así como la insulina demostraron alterar parámetros neuronales, conductuales y fisiológicos después de la administración intranasal en seres humanos (KIRSCH et al., 2005; THOMPSON et al., 2004; REGER et al., 2004).

Corroborando los estudios hechos en humanos, Neumann y colaboradores (2013) encontraron que la OT administrada de forma intranasal en ratones y ratas fue capaz de alcanzar áreas cerebrales de importancia para el comportamiento como la amígdala y el hipocampo.

3 JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos han mostrado que mujeres expuestas a infecciones durante la gestación tienen mayor riesgo de dar a luz a un niño con algún trastorno del neurodesarrollo o neuropsiquiátrico como esquizofrenia y TEA. Factores como el momento de la infección, la intensidad de ésta, además de la predisposición genética, definen el grado de alteración del cerebro del feto y, en consecuencia, el fenotipo de la enfermedad.

La creación y validación de modelos animales resulta de suma importancia para estudiar estos trastornos, su fisiopatología, además de aproximaciones terapéuticas que ayuden a mejorar la sintomatología. Entender el funcionamiento del trastorno, así como los factores de riesgo, es también indispensable para desarrollar estrategias preventivas. Sin embargo, moldear el TEA es todo un desafío ya que los comportamientos principales no se replican completamente en otras especies, por lo cual es de vital importancia continuar perfeccionando los modelos existentes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la administración de oxitocina intranasal en el comportamiento de animales sometidos a activación inmune materna por LPS en el periodo prenatal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A continuación, se presentan los objetivos específicos:

- a) Evaluar alteraciones de comunicación, interacción social, conductas motoras repetitivas/estereotipadas en las crías de hembras sometidas a activación inmune materna por LPS durante la gestación;
- b) Evaluar los efectos de la administración intranasal de oxitocina en los animales tratados de forma prenatal con LPS, en la comunicación, interacción social, conductas motoras repetitivas/estereotipadas;
- c) Evaluar los efectos del tratamiento prenatal con LPS en la expresión de receptores de oxitocina (OTR) en la región de la corteza prefrontal del encéfalo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Fueron utilizadas 55 ratas hembras Wistar adultas a partir de 8 semanas de edad (200-250 gr) y 16 machos adultos experientes provenientes del bioterio de la Universidade Federal de Alfenas. Fueron mantenidos en cajas de polipropileno a temperatura ambiente de $\pm 21^{\circ}\text{C}$, un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con agua y concentrado a disposición. Los animales fueron ambientados durante 15 días en el bioterio del Laboratorio de Fisiología Translacional de la UNIFAL-MG, sede Santa Clara.

5.2 REPRODUCCIÓN

Posteriormente los animales fueron colocados en cajas para apareamiento en razón de 1 macho para cada 2 hembras durante 4 días. Desde el primer día fueron realizados lavados y frotis vaginales hasta la detección de espermatozoides, cuando las hembras fueron separadas y alojadas en cajas individuales contando como el día cero de gestación (GD0) y mantenidas bajo las mismas condiciones de temperatura, luz, agua y alimento.

5.3 DROGAS UTILIZADAS

Para este trabajo fue utilizado lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 026:B6, Sigma-Aldrich (10mg/ml) disuelto en solución salina 0.9%; y oxitocina (OT), O6379 Sigma-Aldrich también disuelto en solución salina 0.9% ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

5.4 ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN: MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO

El modelo experimental de autismo fue inducido por medio de la administración intraperitoneal de LPS a una dosis de 500µg/kg en el día dieciséis de gestación (GD16). Los animales control recibieron una dosis equivalente de solución salina al 0.9% (1ml/kg) también por vía intraperitoneal.

Se escogió el GD16 y la dosis de 500µg/kg basados en un trabajo previo realizado en este laboratorio por Vieira (2017), donde se pudo inducir el comportamiento de enfermedad en las ratas gestantes. Urakubo y colaboradores (2001) utilizaron la misma dosis de LPS durante el día 16 de gestación en ratas, y encontró que hubo alteraciones en la expresión de citoquinas en la placenta, líquido amniótico y el cerebro del feto. Según Kaufman (2003, en MEYER et al., 2006), el último tercio de la gestación en ratones y ratas corresponde al segundo tercio de la gestación en humanos respecto al desarrollo del Sistema Nervioso Central.

5.5 GRUPOS EXPERIMENTALES

Las hembras gestantes, así como sus respectivas camadas fueron divididas en dos grupos como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 1 - Grupos experimentales de madres gestantes.

Grupo control	Grupo LPS
compuesto por 15 hembras que recibieron inyección de solución salina intraperitoneal durante el decimosexto día de gestación.	compuesto por 40 hembras que recibieron inyección de LPS intraperitoneal durante el decimosexto día de gestación, de acuerdo al modelo experimental de autismo.

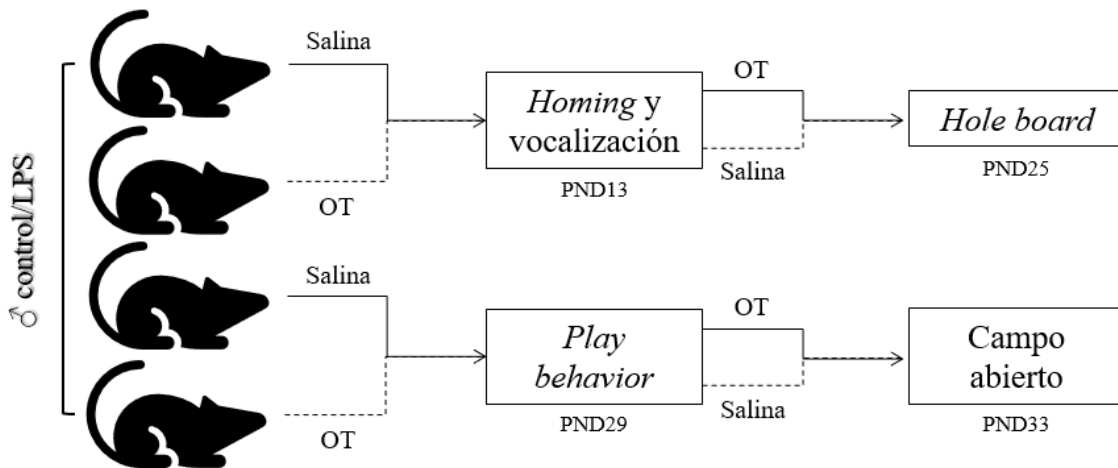
Fuente: de la autora.

5.6 OXITOCINA INTRANASAL

Dentro de cada grupo, los animales machos de cada camada fueron tratados con solución salina 0,9% de forma intranasal u oxitocina (OT) intranasal $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ambos en un volumen total de $20\mu\text{l}$ por animal, diez minutos antes de cada experimento, pues se sabe que después de la administración intranasal de OT, los niveles en amígdala e hipocampo aumentan dentro de los primeros treinta minutos (NEUMAN et al., 2012), alcanzando concentraciones altas en el cerebro 5 minutos después de la aplicación (TANAKA et al., 2018). La solución fue administrada en la región del *rhinarium* (piel alrededor de las fosas nasales) usando una pipeta hasta difundir dentro de las fosas, la administración fue rápida y la manipulación fue consistente entre los grupos. La dosis elevada fue utilizada con el fin de garantizar una captación eficiente debido a la forma de administración.

De cada camada, dos animales pasaron por el mismo experimento ($n=15$), cada animal con un tratamiento diferente. Después, los mismos dos animales pasaron para el siguiente experimento, pero con un tratamiento diferente (Figura 1).

Figura 1 - Pruebas experimentales realizadas a los animales de cada camada del grupo control y del LPS.



Fuente: de la autora

Todos los experimentos se realizaron entre 7:00 am e 1:00 pm.

5.7 PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS RATAS GESTANTES: COMPORTAMIENTO DE ENFERMEDAD

A continuación, se describen los experimentos realizados en las ratas gestantes durante el día dieciséis y diecisiete de gestación.

5.7.1 Campo abierto

En el día GD16, dos horas después de recibir tratamiento con LPS o solución salina, las ratas gestantes fueron sometidas al test de campo abierto para evaluar la actividad locomotora y así caracterizar el comportamiento de enfermedad, pues la reducción de la actividad locomotora representa un excelente patrón para la evaluación de los efectos y las respuestas a la activación inmunológica aguda (ENGELAND et al., 2001; KOZAK et al., 1994).

El aparato es una arena circular de acrílico transparente con diámetro de 60 cm, con paredes de 50 cm de altura y un fondo negro. Cada animal fue colocado en el centro de la arena y filmado por una cámara de techo durante 5 minutos. Cada video fue almacenado para posterior análisis. Inmediatamente después de cada animal, el aparato se limpió con una solución de etanol al 5%. Se realizó análisis automático de la distancia recorrida y del tiempo de inmovilidad utilizando el software Ethovision XT versión 9.0 (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EUA).

5.7.2 Ingestión de alimento y ganancia de peso

La anorexia o pérdida de apetito son síntomas comunes que ocurren como resultado de procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos (SAPER et al., 2012 en NILSSON et al., 2017).

Antes de la aplicación de LPS o solución salina, todos los animales fueron pesados y el alimento fue retirado durante dos horas. Posterior al test de campo abierto se introdujo una cantidad

de alimento previamente medida. Veinticuatro horas después (GD17), las hembras fueron pesadas nuevamente, así como el alimento, para evaluar el consumo de alimento y registrar las variaciones de peso subsecuentes al tratamiento.

5.8 PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS CRÍAS

El día del parto se estableció para las crías como (PND0) y aproximadamente 24 horas después se realizó la estandarización de la camada, con 4 hembras y 4 machos para cada camada. Los animales fueron destetados a los 21 días de vida (PND21) y separados por sexo, manteniendo las mismas condiciones originales.

Las pruebas de comportamiento y el seguimiento de peso fueron realizadas en los días PND13, PND25, PND29 e PND33 y serán descritas a continuación. Los experimentos se realizaron únicamente a las crías macho; los cuales fueron tratados diez minutos antes de cada experimento como descrito anteriormente en la figura 1.

5.8.1 Vocalizaciones ultrasónicas (USV)

Las vocalizaciones ultrasónicas son una forma ampliamente estudiada de comunicación en ratas. Dentro de las diferentes especies animales, la comunicación acústica resulta estar dentro de las más importantes, pudiendo manifestar desde estatus social, presencia de predadores, estado físico y, en el caso de crías, pueden ser emitidas ante una situación potencialmente estresante como ser aislados de la camada y la madre (SCHWARTING; WÖHR, 2012; PORTFORS; PERKEL, 2014). Durante el día trece de vida (PND13), cada cría fue aislada por 30 minutos y posteriormente grabada durante 3 minutos por un micrófono de captación ultrasónica suspendido sobre la caja del test de comportamiento de *homing*, conectado a un amplificador (Microphone Amplifier Med Associates inc, modelo ANL-940-1). Las grabaciones fueron almacenadas en un computador a través del software LabChart para posteriormente hacer el análisis del número de vocalizaciones.

El estudio de las USV en crías durante la lactancia contribuye al estudio de interacciones sociales en etapas tempranas de la vida, así como comportamientos de apego, interacciones entre madre y crías, entre otros (SPENCE et al., 2016).

5.8.2 Comportamiento de homing

El test de homing consiste en colocar el animal en una caja de polipropileno, donde el material de suelo (viruta de madera) se divide en cuatro partes iguales; y donde $\frac{1}{4}$ tiene viruta del nido, y los $\frac{3}{4}$ restantes tienen viruta limpia. Cada animal es colocado en el lado opuesto a la viruta del nido con el cuerpo frente a la pared opuesta. Son evaluados el tiempo de latencia para llegar a la región con viruta del nido, tiempo de permanencia y número de salidas.

Este análisis es utilizado para ver la motivación de la cría para alcanzar el nido y mantener contacto con el resto de la camada (MICULECKÁ et al., 2014)

5.8.3 Tabla de orificios (Hole-board)

El test de hole-board es utilizado para estudiar el comportamiento exploratorio (KUMAR; SHARMA, 2015). El test es utilizado también para evaluar comportamientos repetitivos y actividades restrictivas (CRAWLEY, 2007).

El aparato consiste en una caja de vidrio transparente de 40 cm^3 con una tabla de fondo negro elevada a 15cm del fondo de la caja por medio de soportes, la tabla contiene 16 orificios de 2,5 cm de diámetro.

Durante el PND25, los animales fueron sometidos al test. El día anterior, los animales fueron ambientados en el aparato durante 10 minutos sin la tabla de orificios. El día del experimento, los animales fueron colocados en el centro del aparato montado con la tabla de orificios y fueron filmados durante 15 minutos. Inmediatamente después de cada experimento, el aparato se limpió con una solución de etanol al 5%. Los videos fueron almacenados para posterior análisis manual,

teniendo en cuenta el número de veces que el animal colocó la cabeza hasta la altura de la base de las orejas dentro de cada orificio.

5.8.4 Campo abierto

Se realizó el test de campo abierto con el objetivo de ver la actividad locomotora de las crías durante el PND29. Se utilizó una arena circular de acrílico con diámetro de 60 cm y paredes de 50 cm de altura. Cada animal fue colocado en el centro de la arena y filmado durante 20 minutos. Se evaluó la distancia recorrida y el tiempo de inmovilidad de forma automatizada mediante el software EthoVision XT versión 9.0.

5.8.5 Comportamiento de grooming

El comportamiento de grooming también fue evaluado en el campo abierto de forma manual. Se sabe que el grooming es un comportamiento innato, secuencial y, además fisiológico (KALUEFF et al., 2016). La evaluación de este comportamiento ha sido ampliamente utilizada en modelos de autismo para estudiar comportamientos repetitivos y estereotipados (KIRSTEN; BERNARDI, 2017). Se definió el grooming incluyendo la suma del tiempo y la frecuencia de todos los comportamientos de lavado de cabeza, de cuerpo, genital/cola y lamido de patas y piernas.

5.8.6 Comportamiento de juego (Play behavior)

Se realizó el test de comportamiento de juego durante el día 33 (PND33) para evaluar el desempeño social de los animales. El aparato consiste en una caja de vidrio transparente de 40 cm³ con viruta limpia. El día anterior al experimento, los animales fueron ambientados en la caja durante 10 minutos. El día del experimento los animales fueron aislados durante 3,5 horas y posteriormente colocados en la arena en duplas del mismo grupo y tratamiento (salina+salina,

LPS+salina, salina+oxitocina, LPS+oxitocina) en sesiones de 15 minutos. El comportamiento fue analizado de forma manual teniendo en cuenta los siguientes parámetros: tiempo de persecución, tiempo olfateando, frecuencia de *pinning* (cuando el animal se acuesta dejando el vientre visible), y frecuencia de *pouncing* (cuando el animal pasa por encima del compañero solicitando el juego).

La ambientación al nuevo contexto ayuda a evitar la supresión de comportamientos sociales producida por un ambiente nuevo; y el aislamiento previo al test aumenta la motivación social (WILLEY et al., 2009).

Según Panksepp (1981), el pico de comportamiento de juego en ratas se da entre los 32 y 40 días de vida y los diferentes comportamientos manifestados pueden ser indicadores de interacciones sociales recíprocas (SILVERMAN et al., 2010). Kirsten y colaboradores (2010) demostraron que el LPS prenatal reduce comportamientos sociales en las crías.

5.9 SACRIFICIO

Los animales fueron sacrificados por medio de decapitación siguiendo todos los protocolos de bienestar animal. Todos los procedimientos involucrando animales, estuvieron de acuerdo a la *Comissão de Ética no Uso de Animais* de la Universidade Federal de Alfenas (aprobados con el protocolo n° 15/2017).

5.10 WESTERN BLOT

Se utilizaron seis animales del grupo control y seis del grupo LPS para análisis y cuantificación de OTR en las regiones encefálicas de córtex prefrontal, hipotálamo e hipocampo.

Inicialmente, las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. Para el análisis, las estructuras fueron descongeladas y homogeneizadas en un tampón de lisis y un inhibidor de proteasas, después fue calculada la cantidad de proteínas en cada muestra por medio del test de ELISA. Luego, por medio de electroforesis, las proteínas fueron separadas y

posteriormente transferidas a una membrana. Se realizó bloqueo de la membrana para evitar ligaciones inespecíficas. Se utilizó un anticuerpo primario anti OTR (*rabbit* 1:1000, Abcam 181077), anticuerpo secundario anti-*rabbit* (1:4000, *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)*, ab6721, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las membranas fueron escaneadas a través del equipo de captación de imágenes ChemiDoc XRS+ y el software ImageLab versión 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). El análisis fue realizado en el mismo programa.

5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa *GraphPad Prism* versión 7.0 y los valores fueron representados como media \pm error estándar de la media.

Para la comparación de dos medias se utilizó el test *t* de *student*. Para la comparación de los diferentes grupos con dos variables (tratamiento prenatal y tratamiento intranasal) se utilizó el test *two-way* ANOVA seguido del test de *Tukey*. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

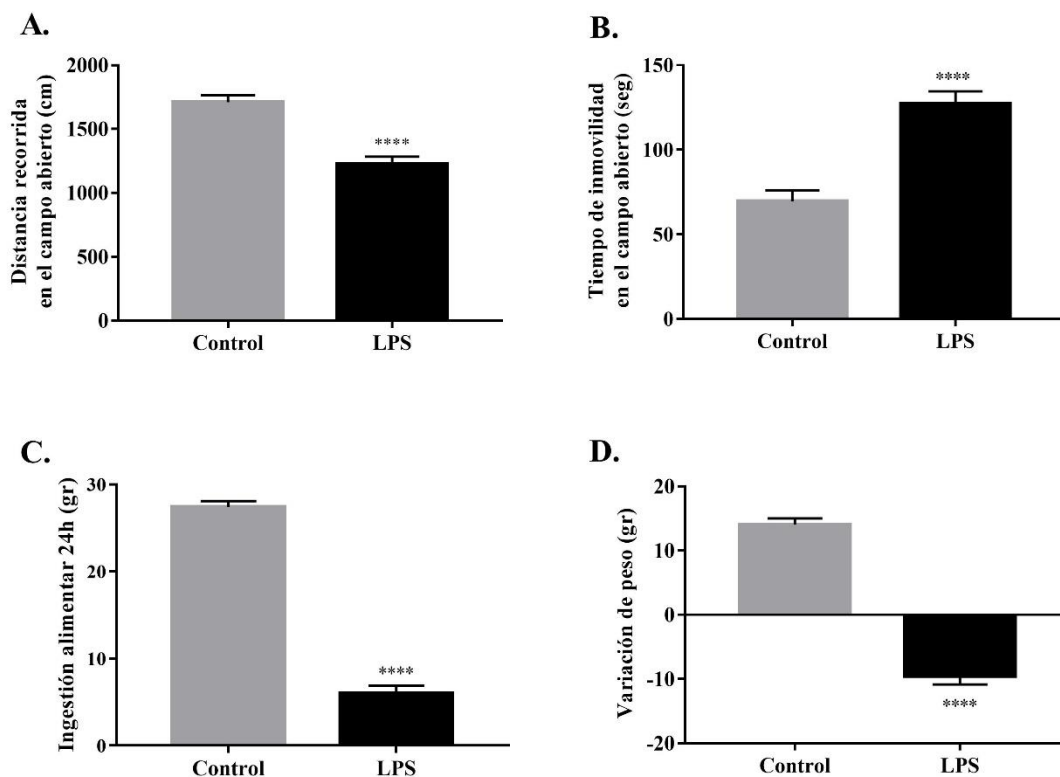
6 RESULTADOS

6.1 PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS RATAS GESTANTES

6.1.1 Comportamiento de enfermedad

A continuación se presentan los efectos de la aplicación de LPS intraperitoneal en el día dieciséis de la gestación (figura 2) en los parámetros evaluados en el campo abierto: distancia recorrida y tiempo de inmovilidad, así como la ingestión alimentaria y variaciones de peso.

Figura 2 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% (control) en el campo abierto en el día dieciséis de gestación (GD16).



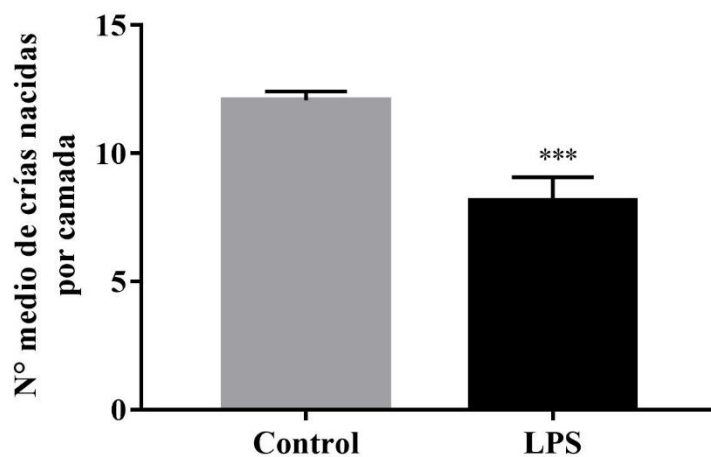
Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media. A.) distancia recorrida en el campo abierto en centímetros 2 horas después de la aplicación de Salina o LPS; B.) tiempo de inmovilidad en el campo abierto 2 horas después de la aplicación de Salina o LPS; C.) ingestión

alimentar 24 horas después de la aplicación de Salina o LPS; D.) variación de peso 24 horas después de la aplicación de Salina o LPS.

En los parámetros evaluados durante el test de campo abierto, los resultados del test *t* de *student* mostraron que los animales tratados con LPS tuvieron reducción de la distancia recorrida ($p < 0,0001$) y tuvieron mayor tiempo de inmovilidad ($p < 0,0001$) en comparación con el grupo control, mostrando disminución de la locomoción. Estos animales también tuvieron una disminución en el consumo de alimento 24 horas después de la aplicación de LPS ($p < 0,0001$), así como tuvieron una pérdida de peso mayor ($p < 0,0001$) durante el mismo tiempo respecto al grupo control.

Figura 3 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% en el GD16 sobre el número medio de crías nacidas vivas por camada.

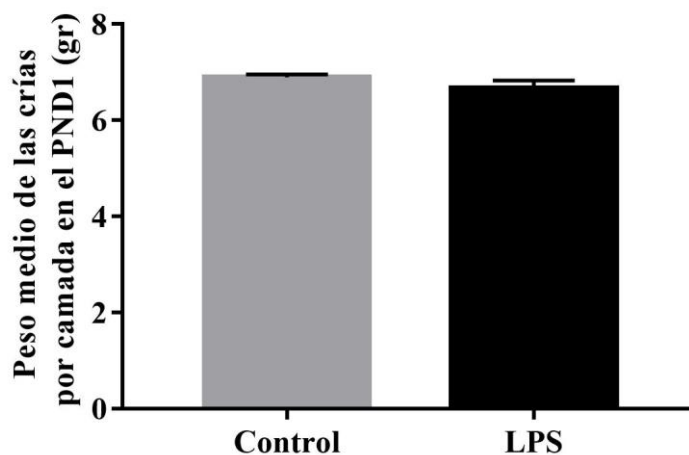


Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media.

En la figura 3 se muestra el número medio de animales nacidos por camada. El tratamiento con LPS afectó el número de animales nacidos vivos, mostrando que la camada fue menor respecto al grupo control ($p = 0,0010$ en el test *t* de *student*).

Figura 4 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% en el GD16 sobre el peso medio de las crías nacidas vivas por camada.

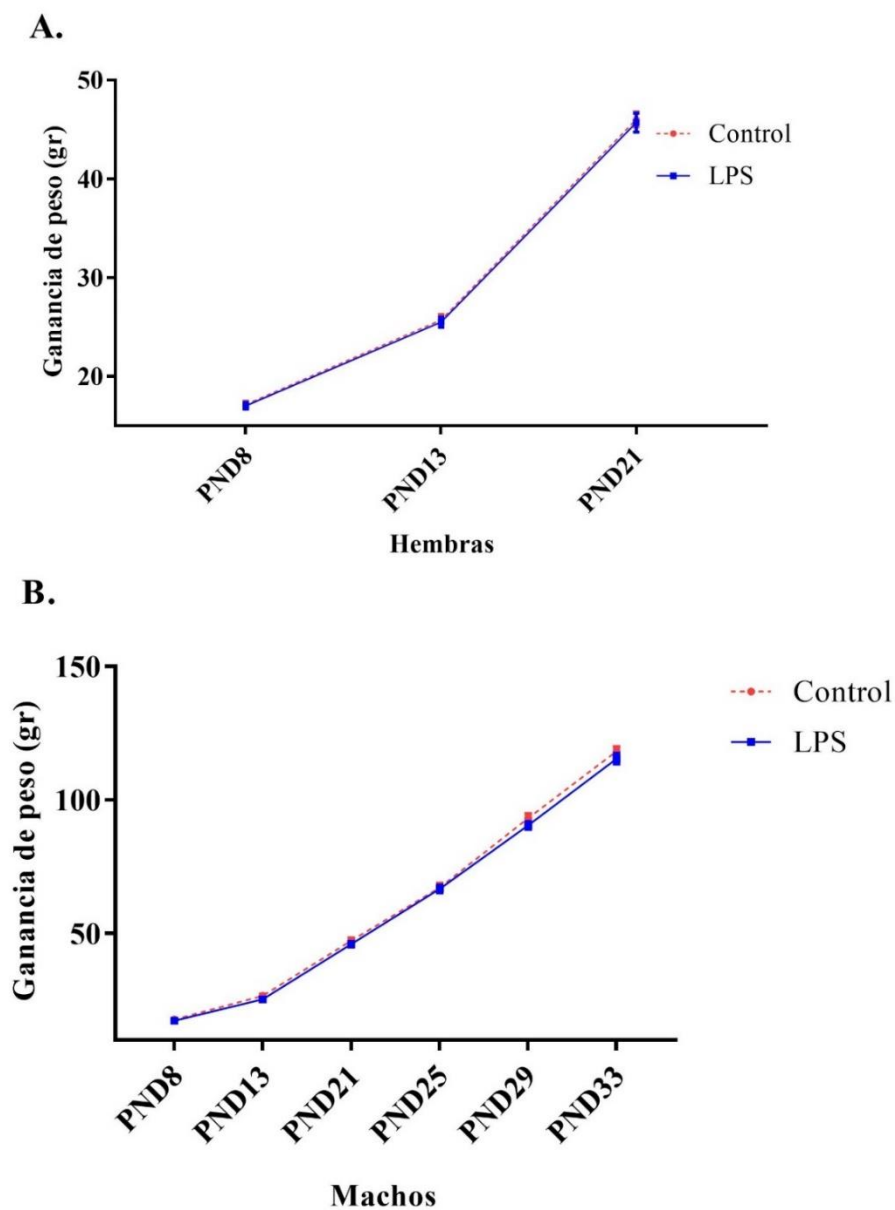


Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media.

La figura 4 muestra el peso medio de las crías por camada para los grupos control y LPS. La aplicación de LPS no afectó el peso de los animales nacidos vivos respecto al grupo control ($p=0.2332$ en el test t de *student*).

Figura 5 - Efectos de la administración intraperitoneal de LPS o salina 0,9% en el GD16 sobre la curva de crecimiento de las crías.



Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media. **A.**) curva de crecimiento de hembras desde la primera semana de vida (PND8) hasta el día del desmame (PND21); **B.**) curva de crecimiento de machos desde la primera semana de vida (PND8) hasta el PND33.

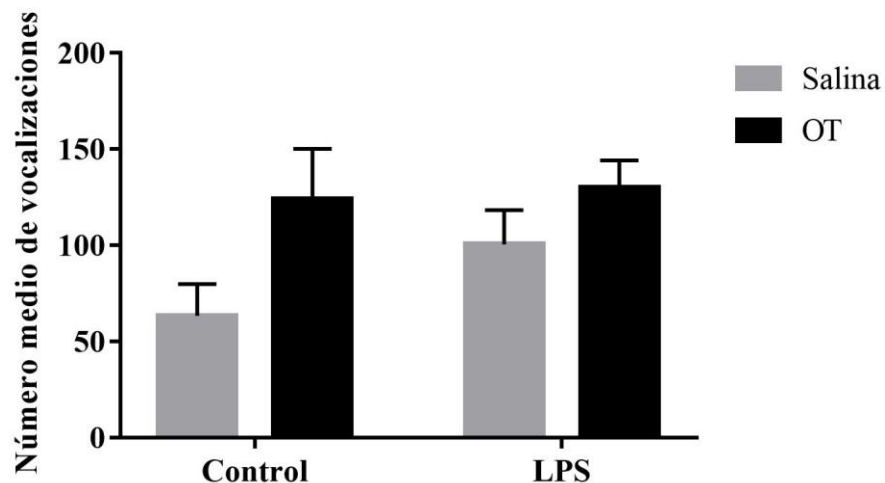
La figura 5 muestra que el tratamiento prenatal con LPS no afectó la ganancia de peso de los machos ni de las hembras ($p=0.2551$ y $p=0,7746$).

6.2 PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LAS CRÍAS

6.2.1 Vocalizaciones ultrasónicas

La grabación de las vocalizaciones ultrasónicas se realizó durante el test de homing. En la figura 6 se muestra el resultado del número de vocalizaciones emitidas durante tres minutos. El test estadístico *two-way* ANOVA mostró que el tratamiento prenatal con LPS no alteró el número de vocalizaciones emitidas ($p=0,2630$), sin embargo, el tratamiento intranasal aumentó el número de vocalizaciones en el grupo control y el grupo LPS ($p=0,0226$). No hubo interacción entre los tratamientos ($p=0,4182$) y tampoco diferencias entre los grupos en el test de *Tukey*.

Figura 6 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en el número de vocalizaciones ultrasónicas para los animales del grupo control y LPS.



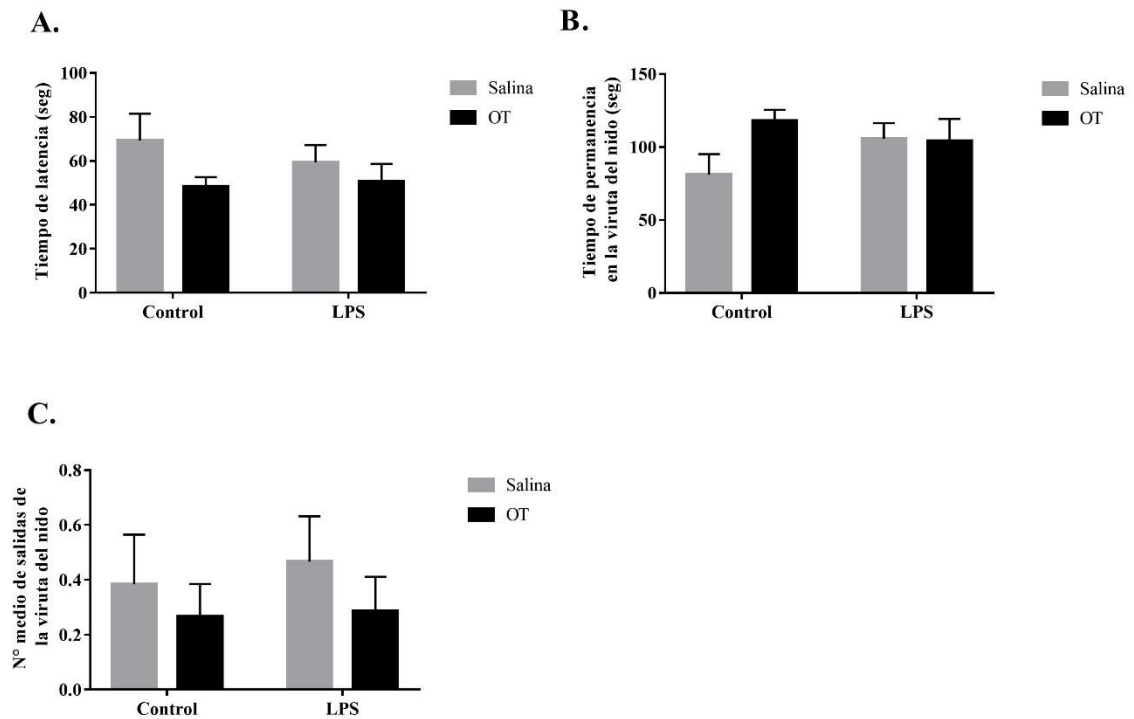
Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media.

6.2.2 Homing

La figura 7 muestra el tiempo de latencia de los animales para llegar a la viruta del nido en el decimotercero día post natal (PND13). El test estadístico *two-way* ANOVA mostró que el tratamiento prenatal con LPS no afectó el tiempo de latencia ($p=0,6470$); al igual que el tratamiento intranasal con OT ($p=0,0827$), sin embargo, se puede observar que tanto en el grupo control como en el LPS, la OT tuvo tendencia a disminuir este tiempo aunque no hubo interacción ($p=0,4669$). El test de *Tukey* no mostró diferencias entre los grupos.

Figura 7 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina (OT) en el desempeño en el test de homing para los animales control o LPS.



Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media. **A.)** tiempo de latencia para llegar a la viruta del nido; **B.)** tiempo total de permanencia en el nido; **C.)** número medio de salidas.

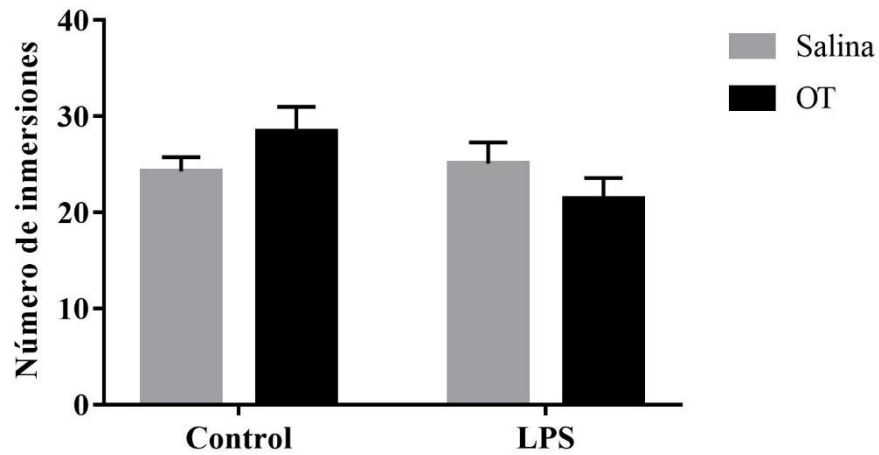
El tratamiento con LPS no alteró el tiempo de permanencia en la región de la viruta del nido ($p=0,6606$), aunque se mostró mayor respecto al grupo control. El tratamiento intranasal no tuvo efectos en el desempeño de las crías en el test ($p=0,1529$). No hubo interacción de los tratamientos para este parámetro ($p=0,1247$).

El número de salidas de los animales después de llegar a la viruta del nido tampoco se vio alterada por el tratamiento prenatal ($p=,7349$) aunque estuvo aumentado en las crías del grupo LPS. El tratamiento intranasal, a pesar de mostrar una disminución en el número de salidas en los dos grupos, no mostró diferencias ($p=0,3189$). Tampoco se observó interacción entre los tratamientos ($p=0,8328$).

6.2.3 Tabla de orificios (Hole-board)

Los resultados del test de *hole board* realizado durante PND25 se presentan a continuación (figura 8). El análisis estadístico de *two-way* ANOVA no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento prenatal ($p=0,1555$) y tampoco respecto al tratamiento intranasal ($p=0,9092$), no obstante, la aplicación de OT intranasal mostró interacción con el tratamiento prenatal ($p=0,0748$); aumentando la respuesta para el grupo control, y disminuyéndola para el grupo LPS. No se encontraron diferencias entre los grupos en el test de *Tukey*.

Figura 8 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en el número de inmersiones en el test de hole board para los animales del grupo control y LPS.



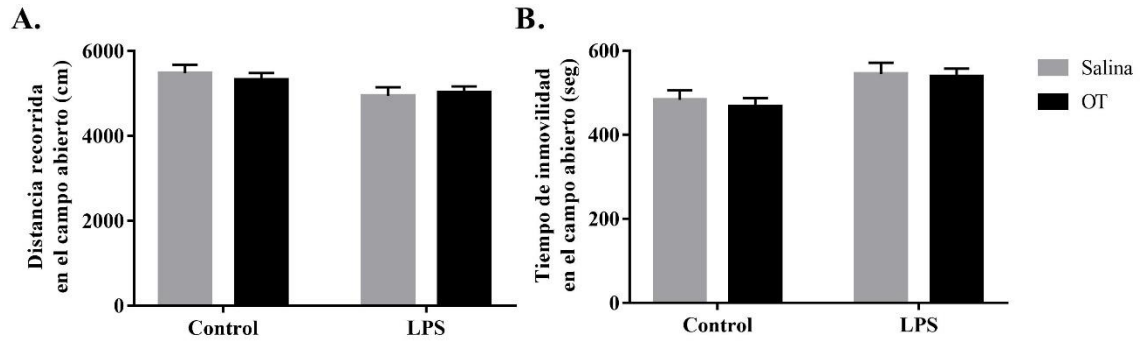
Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media.

6.2.4 Campo abierto

Los resultados del test de campo abierto realizado durante PND29 están representados en la figura 9. El tratamiento prenatal con LPS generó disminución en la distancia recorrida, y aumento en el tiempo de inmovilidad en el campo abierto ($p=0,0229$ y $p=0,0039$ respectivamente, *two-way* ANOVA), no obstante, la administración intranasal de OT no mostró alteraciones en el desempeño de los animales en el campo abierto ($p=0,8290$ para la distancia recorrida; y $p=0,6211$ para el tiempo de inmovilidad), además no hubo interacción entre los tratamientos ($p=0,5094$ y $p=0,8289$). No hubo diferencias entre los grupos en el test de *Tukey*.

Figura 9 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en la distancia recorrida y tiempo de inmovilidad en el test de campo abierto para los animales del grupo control y LPS.



Fuente: de la autora

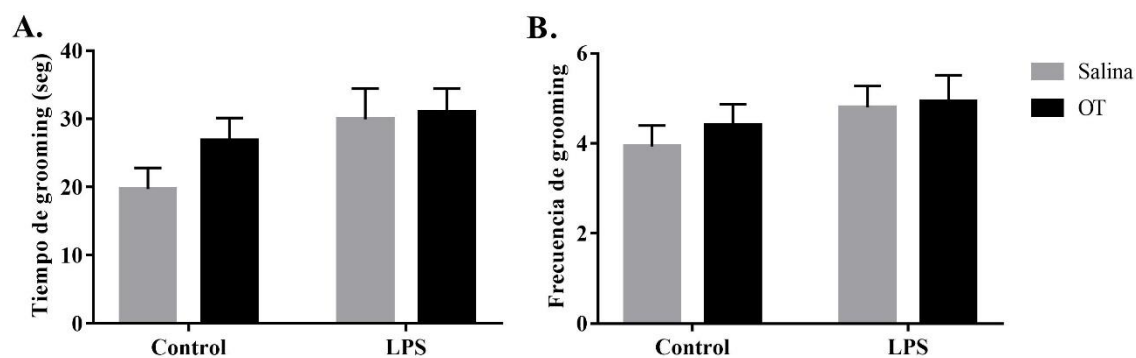
Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media. **A.)** distancia recorrida en el campo abierto en centímetros; **B.)** tiempo de inmovilidad en el campo abierto en segundos.

6.2.5 Comportamiento de grooming

En la figura 10 se observa el resultado del análisis de la frecuencia y el tiempo de grooming en el campo abierto. Los animales tratados de forma prenatal con LPS mostraron mayor tiempo de grooming ($p=0.0515$) sin manifestar diferencias significativas respecto al tratamiento intranasal ($p=0,2631$), que tuvo una tendencia a aumentar el tiempo de este comportamiento en ambos grupos sin generar ninguna interacción ($p=0,3986$, *two-way* ANOVA). El test de *Tukey* no mostró diferencias significativas entre los grupos.

La frecuencia de grooming, aunque también estuvo aumentada en el grupo LPS, no mostró diferencias ($p=0.1649$, *two-way* ANOVA). El tratamiento intranasal también tuvo una tendencia a aumentar la frecuencia, sin embargo, tampoco fue significativa ($p=0,5489$). No hubo interacción entre el tratamiento prenatal y el intranasal ($p=0,7388$). El test de *Tukey* no mostró diferencias significativas entre los grupos.

Figura 10 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en la frecuencia y tiempo de grooming durante el test de campo abierto para los animales control y LPS.



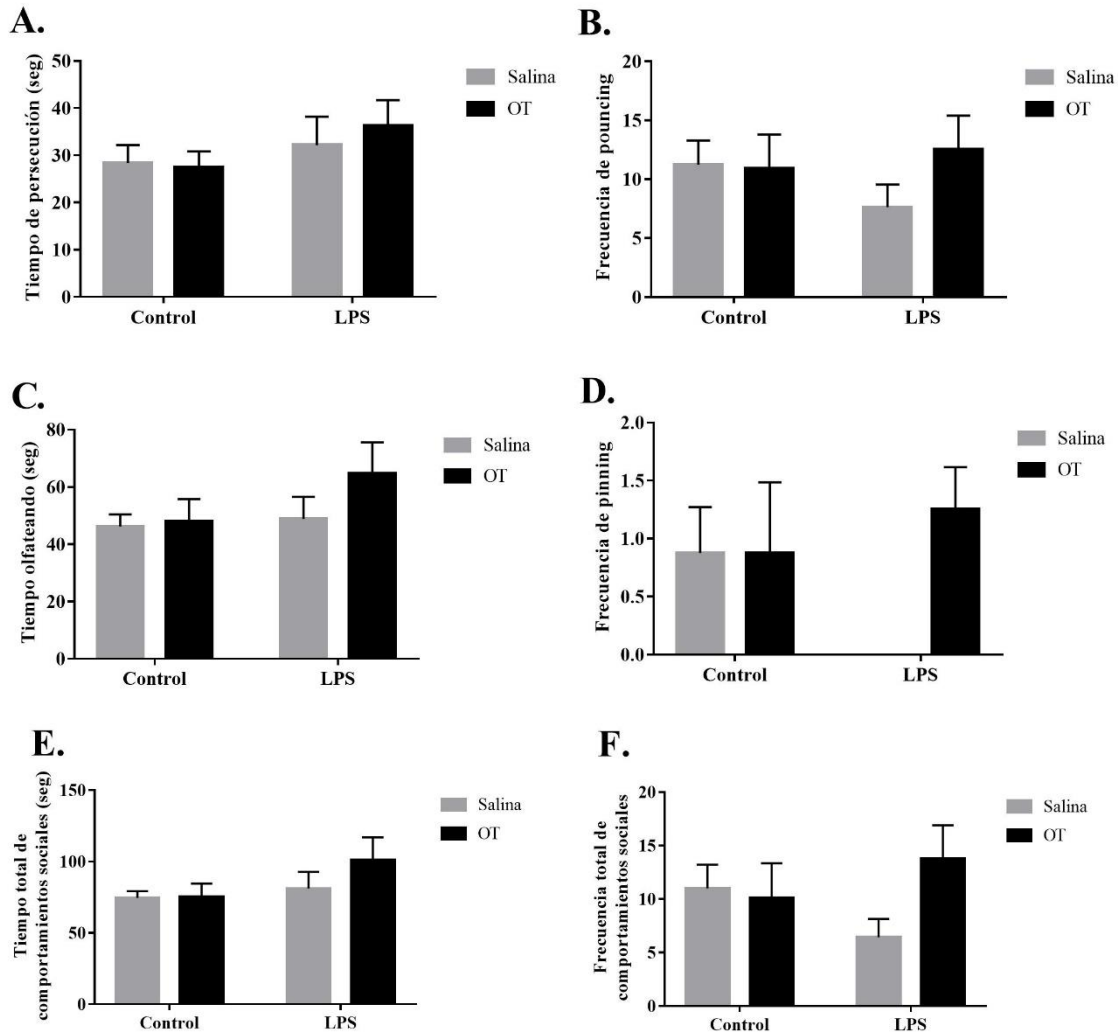
Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media. A.) tiempo de grooming en el campo abierto en segundos; B.) frecuencia de grooming en el campo abierto.

6.2.6 Comportamiento de juego

En la figura 11 se muestran los resultados del test de comportamiento de juego realizado durante PND33.

Figura 11 - Efectos de la aplicación intranasal de salina 0,9% u oxitocina OT en los parámetros evaluados durante el comportamiento de juego para los animales control y LPS.



Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media. **A.)** tiempo de persecución en segundos; **B.)** frecuencia de *pouncing*; **C.)** tiempo olfateando; **D.)** frecuencia de *pinning*; **E.)** tiempo total de comportamientos sociales, y **f.)** frecuencia total de comportamientos sociales.

Los resultados del test *two-way* ANOVA mostraron que la administración prenatal de LPS no alteró el tiempo de persecución ($p=0,7442$), ni el tiempo olfateando al compañero ($p=0,2714$). La administración intranasal de OT tampoco alteró estos parámetros ($p=0,1884$ y $p=0,2223$,

respectivamente), ni hubo interacción de los tratamientos ($p=0,5871$ y $p=0,3768$). El test de *Tukey* no mostró diferencias entre los grupos.

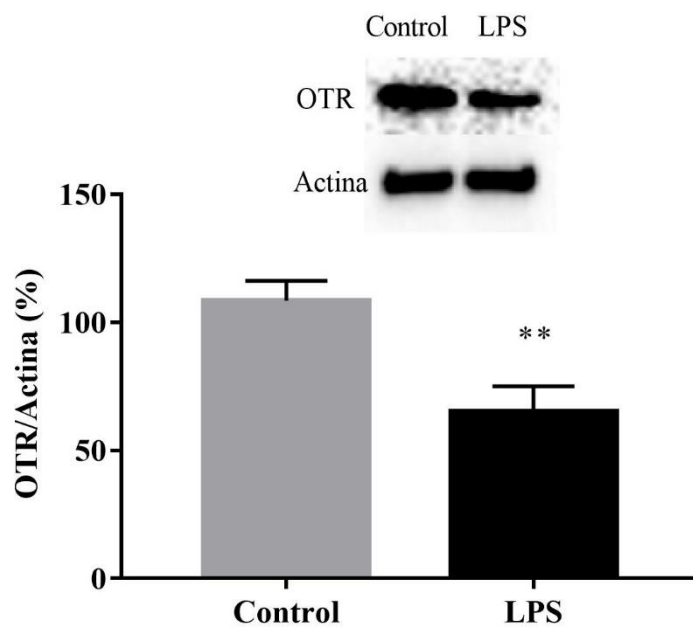
Respecto a las frecuencias de *pouncing* y *pinning* en el test *two-way* ANOVA se encontró que el tratamiento prenatal con LPS no afectó ninguno de los dos parámetros ($p=0,6938$ para la frecuencia de *pouncing*; y $p=0,5591$ para la frecuencia de *pinning*). El tratamiento intranasal con OT tampoco tuvo efectos en el desempeño de los animales en el test de comportamiento de juego ($p=0,3707$ para la frecuencia de *pouncing*; y $p=0,1508$ para la frecuencia de *pinning*). En ningún caso hubo interacción entre los tratamientos ($p=0,3056$ y $p=0,1508$ respectivamente).

Sin embargo, en los gráficos de tiempo olfateando y tiempo siguiendo se observa que la administración intranasal de OT tuvo tendencia a aumentar estos comportamientos, principalmente en el grupo LPS. Así mismo, la frecuencia de *pouncing* y *pinning* se vio levemente aumentada en el grupo LPS después de la administración intranasal de OT.

6.2.7 Western blot

En la figura 12 se observan los resultados de *western blotting* para el receptor de OT (OTR). Los resultados del test *t* de *student* mostraron que los animales del grupo LPS tuvieron menor expresión de OTR en la corteza prefrontal ($p=0,003$) en comparación con el grupo control.

Figura 12 - Expresión de OTR en la corteza prefrontal de encéfalos de animales control y LPS.



Fuente: de la autora

Nota: Valores representados como media \pm error estándar de la media.

7 DISCUSIÓN

7.1 COMPORTAMIENTO DE ENFERMEDAD EN LAS HEMBRAS GESTANTES

El comportamiento de enfermedad es un complejo inducido por infecciones, inflamación, daño a los tejidos o trauma inmune y es mediado por citoquinas proinflamatorias. En el ámbito comportamental, se caracteriza por letargia, ansiedad, anorexia o apetito reducido, disminución de la actividad motora e hipertermia (TAKSANDE et al., 2015; KIRSTEN et al., 2010). Los resultados mostraron que 2 horas después de la administración intraperitoneal de LPS, los animales tuvieron una reducción en la actividad locomotora; y 24 horas después mostraron bajo consumo de alimento y pérdida de peso respecto al grupo control. Una variedad de estudios ha demostrado que, cuando se administra LPS de forma sistémica hay activación de la respuesta inmune innata a través del receptor Toll-like 4 (TLR-4) (SCHEDLOWSKI et al., 2014), la cual consiste principalmente en inducción de citoquinas, inflamación, fiebre, activación de la cascada del complemento, activación el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y comportamiento de enfermedad, modulando también el consumo de alimento y los patrones de sueño mediados por la acción de prostaglandinas (KNUESEL et al., 2014; BOKSA, 2010; SCHEDLOWSKI et al., 2014).

Estos resultados muestran que el LPS y la consecuente liberación de citoquinas fueron capaces de generar una respuesta inmune marcada en la madre y que, probablemente, los fetos también estuvieron expuestos a alteraciones inmunológicas que podrían ser capaces de influenciar alteraciones en el desarrollo neurológico; pues se sabe que el último tercio de la gestación en ratas y ratones corresponde a una ventana de vulnerabilidad a respuestas agudas en el feto por citoquinas, así como disfunciones comportamentales en otras etapas de la vida (KNUESEL et al., 2014). La inflamación producida en el período prenatal ha sido asociada con el desarrollo de trastornos psiquiátricos al afectar el estado inflamatorio del feto y después alterar el desarrollo neurológico del mismo, dejando alteraciones en la función cerebral incluyendo esquizofrenia y autismo (DEPINO, 2015; BOKSA, 2010; MEYER, 2009).

El número medio de crías nacidas vivas por camada estuvo disminuido en el grupo LPS. En humanos se sabe que infecciones inducidas por bacterias gram-negativas pueden ocasionar pérdida

fetal y partos prematuros. Ya en modelos animales se observó que infecciones por LPS pueden ocasionar también absorción y muerte fetal, al igual que partos prematuros (WANG et al., 2014).

Lazer y colaboradores (2002) encontraron que la aplicación de LPS intraperitoneal en ratones indujo muerte embrionaria, lesiones hemorrágicas a nivel placentario y regiones isquémicas, sugiriendo muerte fetal por anoxia inducida por infarto placentario.

Arsenault y colaboradores (2014) también encontraron que la aplicación de LPS i.p. por un lado impactó negativamente la tasa de supervivencia de las crías nacidas, y por otro muchos de los animales tratados no dieron crías viables. En algunos casos se ha encontrado que las hembras tratadas paren crías muertas o simplemente no paren (ARSENAULT et al., 2014; CHLODZINSKA et al., 2011).

Kirsten y colaboradores (2015) encontraron que la administración de LPS i.p. en el día 9,5 de gestación redujo el número de crías nacidas respecto al grupo control. Además, estudios previos de los mismos autores han mostrado que el LPS tiene efectos tóxicos en el desempeño reproductivo, reforzando hallazgos de diversos trabajos donde el LPS indujo abortos espontáneos, reabsorción embrionaria y muerte intrauterina.

Los resultados encontrados respecto al número medio de crías nacidas vivas son respaldados por los resultados de trabajos anteriores, donde el LPS generó abortos, mortinatos y reabsorción y consecuentemente reducción de las camadas, sin embargo, estos parámetros no fueron estudiados en este trabajo.

Respecto al peso de los animales en el primer día de vida, Shi y colaboradores (2003) mostraron que en un modelo de activación inmune materna inducido por el virus de influenza humana no afectó el peso de los animales de la camada. Otros estudios han mostrado resultados divergentes que se podrían atribuir a la dosis de LPS utilizada. Kirsten y colaboradores (2010) sugieren que la reabsorción embrionaria producida por el LPS y, por lo tanto, un menor número de animales por camada podría explicar la ausencia de efectos del LPS sobre el peso de las crías, debido a mayor disponibilidad de alimento y cuidados maternos.

7.2 COMPORTAMIENTO DE LAS CRÍAS

La habilidad de comunicación es uno de los componentes más afectados en niños con TEA. Las vocalizaciones ultrasónicas en crías han sido ampliamente estudiadas, y se sabe que los animales normales las emiten desde el nacimiento hasta el destete (HOFER, 2003). En el presente estudio las vocalizaciones en los animales del grupo LPS, en presencia del olor del nido, estuvieron levemente aumentadas sin mostrar diferencias significativas.

Los resultados de este trabajo divergen con los resultados de Cezar y colaboradores (2018), donde la administración de ácido valproico (VPA) en el día 12,5 de gestación como modelo de autismo mostró una reducción en el número de vocalizaciones en las crías durante el día 11 de vida.

Al igual que Cezar y colaboradores (2018), Gandal y colaboradores (2010) encontraron que tras la administración de VPA en el periodo prenatal, los animales tratados tuvieron una reducción en el número vocalizaciones. Servadio y colaboradores (2016) también encontraron una disminución significativa en el número de vocalizaciones de animales tratados en el periodo prenatal con VPA. En modelos de autismo por activación inmune materna con LPS y Poly(I:C) se espera que haya déficits en la comunicación, encontrando reducción en el número de USV's (PATTERSON, 2011; MALKOVA et al., 2012). Todos los estudios anteriores concluyeron que estos modelos de activación inmune materna generan déficits en la comunicación en las crías antes del destete.

Kirsten y colaboradores (2015) administraron LPS i.p. en el día 9,5 de gestación y no encontraron diferencias significativas respecto al grupo control, sin embargo, en un análisis más detallado de las vocalizaciones, encontraron diferencias en la duración del periodo de silencio en estos individuos.

Diversos estudios han demostrado que el aislamiento induce un alto índice de vocalizaciones en las crías, mostrando que podrían ser señales de llamada para la madre (HOFER; SHAIR, 1978; BOULANGER-BERTOLUS et al., 2017). Los animales del grupo LPS mostraron un comportamiento normal de vocalizaciones ante un evento de estrés como es el aislamiento de la madre y el resto de la camada, además de estar en un ambiente desconocido, mostrando que la

presencia de una pista familiar como es el olor del nido no generó ninguna diferencia en el comportamiento de vocalización de estos individuos.

Oswalt y Meier (1975) demostraron que pistas olfatorias, además de táctiles y térmicas, influyen USV's en crías de ratas normales. Hofer y Shair (1978) demostraron que la interacción recíproca de comportamiento no es crucial para la emisión de USV's y que la presencia pasiva de la madre o un compañero de la camada es suficiente para reducir el número de vocalizaciones del individuo en un ambiente desconocido, lo que podría explicar por qué los animales del grupo control vocalizaron menos que los animales del grupo LPS, sabiendo que estaban en presencia del olor del nido.

El incremento de la actividad locomotora y el aumento de las USV's en individuos después de ser separados de sus compañeros sociales es una característica consistente en mamíferos ante un evento de estrés por separación (HOFER; SHAIR, 1978).

En el presente estudio se encontró que la administración intranasal de OT influyó en el número de vocalizaciones tanto en los animales control como en los animales LPS. Insel y Winslow (1991) encontraron que la administración de OT de forma intracerebroventricular disminuyó el número de vocalizaciones inducidas por aislamiento en crías de ratas normales, asociándolo a disminución de comportamiento de ansiedad. Lopatina y colaboradores (2017) concluyeron que la administración intraperitoneal de oxitocina exógena en ratones Cd157-KO con déficits de comunicación (menor cantidad y variedad de USV's) podría mejorar las habilidades comunicativas de estos animales.

Se podría interpretar que en este estudio la OT actuó mejorando las habilidades comunicativas de los animales, sin embargo, se sugiere estudiar más profundamente las vocalizaciones en cuanto a su complejidad.

El test de homing es utilizado para evaluar las habilidades motoras, cognitivas y sensoriales necesarias para diferenciar un olor neutro del olor de su propio nido (MELANCIA et al., 2017), además de ser considerado un test para evaluar la motivación del animal para alcanzar el nido y mantener contacto con el resto de la camada (MICULECKÁ et al., 2014).

Varios estudios sugieren que las asociaciones aprendidas entre olores y la estimulación materna juegan un papel crucial para el desarrollo de comportamientos sociales (TERRY; JOHANSON, 1996).

Contrario a lo encontrado en este trabajo, Servadio y colaboradores (2016) mostraron que los animales expuestos a VPA son incapaces de diferenciar pistas olfativas, aumentando el tiempo de latencia para llegar al material del nido.

Foley y colaboradores (2014) administraron de forma subcutánea ácido propiónico (un ácido graso de cadena corta que es un producto metabólico de varias bacterias entéricas) o LPS, encontrando que el ácido propiónico aumentó el tiempo de latencia para llegar a la región del nido en el test de homing, sin embargo, al igual que en este trabajo, no encontraron diferencias en los animales tratados con LPS respecto al grupo control.

Batista y colaboradores (2018) encontraron que, en un modelo de autismo inducido por restricción proteica durante la gestación y la lactancia, los animales demoraron más tiempo en llegar a la región del nido respecto al grupo control.

Los animales del grupo LPS demoraron menos tiempo en llegar a la viruta del nido y también permanecieron más tiempo, aunque atravesaron más veces el límite de la viruta, mostrando mayor actividad exploratoria. Los resultados obtenidos en el test de homing son divergentes con trabajos previos y muestran que no hubo diferencias en el desempeño de los animales del grupo LPS respecto al grupo control, lo que podría indicar que no hubo un déficit en la diferenciación de señales olfativas como sería lo esperado.

Diversos estudios sugieren que señales químicas como el olor del pezón pueden mantenerse en la memoria olfativa de las crías. La memoria olfativa en los neonatos es mediada por OT, la cual es liberada en el cerebro del lactante mientras succiona y actúa en el bulbo olfativo, donde puede mejorar la activación neural relacionada con la memoria mediante la potenciación a largo plazo (NAGASAWA et al., 2012). Los neonatos tienen una atracción innata por la madre y, su olor tiene la capacidad de atraer a las crías, lo que podría explicar la disminución en la latencia de llegada a

la viruta del nido después de la administración de OT intranasal, además de una leve tendencia a mantenerse en esa porción de la viruta y salir menos de ella.

Ya en el test de hole-board, los animales del grupo control y LPS no mostraron ninguna diferencia, sin embargo, la OT tuvo efectos contrarios en ambos grupos.

Kumar y Sharma (2016) utilizaron el test de hole-board para evaluar el comportamiento exploratorio de animales tratados de forma prenatal con VPA, encontrando que éste fue capaz de disminuir el número de veces que el animal colocó la nariz dentro de los orificios, concluyendo así, que el VPA redujo la actividad exploratoria de los animales.

De acuerdo a Crawley (2007), donde se sugiere utilizar el test de hole-board como una forma de evaluar comportamientos repetitivos y actividades restrictivas, se espera que el desempeño de los animales de cualquier modelo de autismo sea alto en esta tarea, es decir, que la frecuencia de las inmersiones en los orificios sea mayor.

No fue posible concluir los resultados encontrados respecto al test de hole-board ya que no hubo ninguna diferencia entre los grupos y fueron divergentes con estudios previos. Los efectos de la administración de OT fueron contrarios entre los grupos, sugiriendo que podría existir alguna diferencia en los mecanismos de acción y su resultado en la conducta de los individuos.

El test de campo abierto mostró que los animales del grupo LPS tuvieron actividad locomotora disminuida. Corroborando estos resultados, Depino (2015) encontró que la activación inmune materna inducida por LPS generó un efecto a largo plazo en las crías disminuyendo la actividad exploratoria durante el test de campo abierto. Al-Amin y colaboradores (2016) también encontraron la actividad locomotora en el campo abierto disminuida en ratones adultos crías de hembras tratadas con LPS durante el día 16 y 17 de gestación, indicando déficits comportamentales a lo largo la vida de las crías. En estos estudios se ha sugerido que la actividad locomotora disminuida podría estar relacionada con comportamientos asociados a ansiedad.

La OT no generó alteraciones en los parámetros de distancia recorrida y tiempo de inmovilidad en el campo abierto en ninguno de los grupos.

El análisis del comportamiento de grooming se realizó con el objetivo de estudiar comportamientos repetitivos y estereotipados, los cuales han sido ampliamente estudiados en modelos de autismo (KIRSTEN; BERNARDI, 2017). En este estudio se encontró que el tiempo de grooming en el grupo LPS estuvo aumentado, sin embargo, la frecuencia no mostró ninguna diferencia respecto al grupo control.

Cabe resaltar que el grooming es un comportamiento innato, secuencial y, además fisiológico con una microestructura establecida (KALUEFF et al., 2015). Sin embargo, este comportamiento puede persistir por períodos inusuales de tiempo (SILVERMAN et al., 2010), que se asemejan a comportamientos de tipo compulsivo evidenciados en individuos con trastornos neuropsiquiátricos incluyendo el TEA (KIRSTEN; BERNARDI, 2017).

Kirsten y Bernardi (2017) encontraron resultados semejantes a los de este trabajo, donde el tiempo y la frecuencia de grooming estuvieron aumentados, siendo compatible con una de las características más relevantes del TEA. En el trabajo de Schwartzer y colaboradores (2013), un modelo genético de autismo en conjunto con activación inmune durante la gestación (ratones BTBR + Polyl:C en el GD12.5) también se encontró aumento en la frecuencia de grooming. Kalueff y colaboradores (2016) resaltan en su revisión que el comportamiento de grooming podría asociarse a modelos de TEA; y que, en varios de estos modelos, principalmente genéticos, se ha demostrado que este comportamiento está aumentado.

En este estudio se observó también que la OT intranasal aumentó tanto el tiempo como la frecuencia de grooming aunque no se observaron diferencias significativas. Se ha demostrado que la administración de OT de forma intracerebroventricular induce aumento dosis-dependiente en el comportamiento de grooming y que el hipotálamo juega un papel crítico en el control de éste (VAN WIMERSMA et al., 1990; ARGIOLAS; GESSA, 1991; EPPERSON et al., 1987). Van Wimersma y colaboradores (1990) estudiaron la microestructura del grooming y descubrieron que el aumento en el tiempo total de este comportamiento fue debido a un aumento en el grooming anogenital, sugiriendo que el aumento provocado por la OT podría estar asociado con su papel en el comportamiento reproductivo. Para entender los efectos de la OT intranasal en el comportamiento de grooming es necesario estudiar los mecanismos de acción de ésta.

Los resultados de este trabajo en el test de comportamiento de juego no mostraron diferencias entre los grupos, sin embargo, se pudo observar que los animales del grupo LPS tuvieron una tendencia a explorar más al compañero (seguir y olfatear) y menos tendencia a solicitar y responder al juego (pinning y pouncing).

Varios estudios han mostrado que el juego en ratas juveniles consiste en patrones de comportamiento relacionados con el comportamiento social, sexual y agresivo; y que los animales que juegan menos tienen vínculos más débiles con el grupo en la vida posterior (VANDERSCHUREN et al., 1997). Se cree que el juego social tiene un papel a nivel cognitivo, pues sirve para desarrollar la capacidad de los individuos para comprender y expresar señales de comunicación intraespecíficas, ayudando así a mantener la estabilidad del grupo y evitar agresiones (BEKOFF, 1972).

En diversos trabajos se ha estudiado el comportamiento social en animales de modelos de activación inmune materna. Al igual que en el presente trabajo, Foley y colaboradores (2014) no encontraron diferencias significativas en la interacción social de animales en el periodo neonatal ni en la adolescencia después de aplicar LPS en el GD12, sin embargo, encontraron diferencias durante la adultez.

Otros estudios de Kirsten y colaboradores (2010) y Taylor y colaboradores (2012) encontraron todos los parámetros sociales de los animales del grupo LPS disminuidos respecto al grupo control, sugiriendo que comportamientos anormales de juego podrían indicar una disminución en la motivación de las crías inducido por la administración de LPS en el periodo prenatal.

En el presente trabajo, la administración intranasal de OT no generó diferencias en ninguno de los grupos para el test de comportamiento de juego. Sin embargo, fue posible observar una tendencia a aumentar todos los parámetros evaluados tanto en los animales del grupo control como en los animales del grupo salina.

En contraste con los resultados obtenidos en este trabajo, Huang y colaboradores (2014) encontraron que la administración aguda de OT intranasal redujo el comportamiento social en

ratones machos normales no-familiares e incrementó el comportamiento social con hembras, validando los efectos de la OT como facilitador de comportamientos reproductivos y sociosexuales en roedores.

Diversos estudios han mostrado discrepancia en los resultados respecto a la administración de OT y su relación con el comportamiento social. Munesue y colaboradores (2016) encontraron mejoras en la interacción social recíproca en individuos con TEA tratados con OT intranasal, sin embargo, existe una gran variedad de limitaciones en estudios realizados en humanos, por lo cual es necesario continuar perfeccionando los modelos animales y, de esta forma, entender mejor las bases fisiológicas de trastornos del neurodesarrollo como es el TEA y así tener una aproximación terapéutica más acertada.

La relación entre la expresión de OTR y el TEA ha sido ampliamente investigada, sin embargo, existen inconsistencias entre las alteraciones causadas por los diferentes polimorfismos de un solo nucleótido, o SNP's (LOPARO; WALDMAN, 2015), además han sido realizadas en contextos limitados (cantidad de muestras y de SNP's estudiados). Tansey y colaboradores (2010) no encontraron asociaciones entre la expresión de OTR y el TEA. Di Napoli y colaboradores (2014) encontraron relación entre algunas variantes genéticas de OTR y la presentación de síndrome de Asperger. Diversas investigaciones han mostrado que las diferencias individuales en la biología de la OT (producción y niveles plasmáticos, así como expresión de OTR) están asociadas con las diferencias individuales en el funcionamiento social (PARKER et al., 2014), además de las diferencias raciales.

Para evaluar si las alteraciones comportamentales fueron afectadas por la expresión disminuida de OTR en los animales del grupo LPS, valdría la pena estudiar en el presente modelo de TEA por activación inmune materna, relaciones de causalidad entre los SNP's asociados a la expresión de OTR y sus efectos en el comportamiento.

Se cree que la heterogeneidad del TEA puede jugar un papel importante en estos resultados; pues la respuesta a la administración de OT puede ser influenciada por las diferencias endógenas de cada individuo respecto a producción y expresión de receptores (PARKER et al., 2017; PARKER et al., 2014). Además, estudios en pacientes con TEA han mostrado diferencias en la concentración basal de OT en comparación con controles. También, se ha demostrado que los

pacientes con menores niveles plasmáticos de OT tienen mayores déficits sociales y se han visto beneficiados con el tratamiento intranasal, sin embargo, no ha sido en todos los casos (LOPARO; WALDMAN, 2015; PARKER et al., 2014; PARKER et al., 2017).

8 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la administración intraperitoneal de LPS a una dosis de 500 μ g/kg en el día 16 de gestación logró inducir comportamiento de enfermedad en las hembras gestantes, así como influyó en el tamaño de las camadas. Sin embargo, algunos parámetros como la susceptibilidad de las hembras al LPS no fueron evaluados en este trabajo.

La administración intraperitoneal de LPS durante el día 16 de gestación no generó deficiencias en ninguna de las principales características del TEA en las crías. Las cuales presentaron gran variedad de comportamientos discordantes respecto al grupo control y respecto a estudios previos.

La administración intranasal de OT no tuvo efectos significativos en el comportamiento de los animales, no obstante, fue evidente una tendencia a aumentar el número de USV's, disminuir el tiempo de latencia en el test de homing, y aumentar la frecuencia de pinning y pouncing en el test de comportamiento de juego.

Se pudo demostrar que los animales tratados con LPS en el periodo neonatal tuvieron menor expresión de OTR en la corteza prefrontal del encéfalo.

La administración intraperitoneal de LPS durante la gestación, así como otros modelos de activación inmune materna han demostrado tener efectos sobre el comportamiento de las crías, compatibles con enfermedades neuropsiquiátricas. La administración de LPS y de OT en este trabajo demostraron tener un potencial para alterar el comportamiento de los animales. Sin embargo, las alteraciones del comportamiento en modelos animales de TEA (así como en humanos), dependen de diversos factores individuales que llevan a las manifestaciones variadas características del trastorno.

REFERENCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Autism spectrum disorder. Washington: Duke Center for Autism and Brain Development. Aug. 2018. Disponible en: <https://www.psychiatry.org/patients-families/autism/what-is-autism-spectrum-disorder>. Consultado: 20 Sept. 2018.
- ANOMAL, R. F. et al. Impaired processing in the primary auditory cortex of an animal model of autism. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, n. 158, 2015.
- AL-AMIN, M. M. et al. Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 11, 2016.
- ARGIOLAS, A.; GESSA, G. L. Central functions of oxytocin. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 15, n. 2, p. 217–231, 1991.
- ASHWOOD, P.; WILLS, S.; VAN DE WATER, J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 1, p. 1–15, 2006.
- BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, p. 1–9, Jan. 2018.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.
- BOULANGER-BERTOLUS, J. et al. Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CEZAR, L. C. et al. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 84, p. 173–180, 2018.
- CRAWLEY, J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **Brain Pathology**, v. 17, p. 448–459, 2007.
- CHADMAN, K. K. Animal models for autism in 2017 and the consequential implications to drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 1187–1194, 2017.
- CHLÓDZINSKA, N., et al. Lipopolysaccharide injected to pregnant mice affects behavior of their offspring in adulthood. **Acta Neurobiol Exp**, v. 71, p. 519–527, 2011.
- DEPINO A.M. Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, v. 299, p. 56–65, 2015.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 61–78, 2009.

DICICCO-BLOOM, E., et al. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 26, p. 6897–6906, 2006.

DI NAPOLI, A., et al. Genetic variation in the oxytocin receptor (OXTR) gene is associated with Asperger Syndrome. **Molecular Autism**, v. 5, n. 1, p. 48, 2014.

ENGELAND, C.G., et al. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 4, p. 481–491, 2001.

EPPERSON C.N.; MCDOUGLE C.J.; PRICE L.H. Intranasal oxytocin in obsessive-compulsive disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, n. 3, p. 231–236, 1987.

FOLEY, K. A., et al. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 39, p. 68–78, 2014.

GANDAL, M. J., et al. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 12, p. 1100–1106, 2010.

HOFER, M. A. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 2, p. 1–15, 2003.

HOFER, M. A.; SHAIR, H. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. **Developmental Psychobiology**, v. 11, n. 5, p. 495–504, 1978.

HUANG, H., et al. Chronic and acute intranasal oxytocin produce divergent social effects in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1102–1114, 2014.

INSEL, T. R.; WINSLOW, J. T. Central oxytocin modulates the infant rat's response to social separation. **European Journal of Pharmacology**, v. 203, n. 1, p. 149–152, 1991.

KALUEFF, A. V., et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.

KIRSCH, P., et al. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. **J. Neuroscience**, v. 25, p. 11489–11493, 2005.

KIRSTEN, T. B.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: repetitive self-grooming and stereotypies. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 25–29, 2017.

KIRSTEN, T. B., et al. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sciences**, v. 30, p. 12–17, 2015.

KIRSTEN, T. B., et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **NeuroImmunoModulation**, v. 17, n. 4, p. 240–251, 2010.

KNUESEL, I., et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 11, p. 643–660, 2014.

KOZAK, W.; CONN, C. A.; KLUGER, M. J. Lipopolysaccharide locomotor activity induces fever and depresses in unrestrained mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 1, p. 125–R135, 1994.

KUMAR, H.; SHARMA, B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. **Brain Research**, v. 1630, p. 83–97, 2016.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 2, p. 219–225, 2010.

LA ROCCA, C., et al. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. **Immunology Letters**, v. 162, n. 1, p. 41–48, 2014.

LEVY, S. E.; MANDELL, D. S.; SCHULTZ, R. T. Autism. **The Lancet**, v. 374, n. 9701, p. 1627–1638, 2009.

LOPARO, D.; WALDMAN, I. D. The oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with autism spectrum disorder: A meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 5, p. 640–646, 2015.

LORD, C., et al. Autism spectrum disorder. **The Lancet**, v. 392, p. 508–520, 2018.

MALKOVA, N. V., et al. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 4, p. 607–616, 2012.

MELANCIA, F., et al. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behavioural Brain Research**, n. 321, p. 113–122, 2017.

MEYER, U., et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4752–4762, 2006.

MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, S. H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1061–1079, 2009.

MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 8, p. 469–482, 2017.

MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 425–433, 2010.

MUNESUE, T., et al. Oxytocin for male subjects with autism spectrum disorder and comorbid intellectual disabilities: a randomized pilot study. **Frontiers in Psychiatry**, v. 7, n. 2, 2016.

NAGASAWA, M., et al. Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 6, n. 31, 2012.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, 2010.

NEUMANN, I. D., et al. Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 1985–1993, 2013.

NILSSON, A., et al. Inflammation-induced anorexia and fever are elicited by distinct prostaglandin dependent mechanisms, whereas conditioned taste aversion is prostaglandin independent. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 61, p. 236–243, 2017.

OSWALT, G. L.; MEIER, G. W. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 8, n. 2, p. 129–135, 1975.

PANKSEPP, J. The ontogeny of play in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 14, n. 4, p. 327–332, 1981.

PARKER, K. J., et al. Intranasal oxytocin treatment for social deficits and biomarkers of response in children with autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 30, p. 8119–8124, 2017.

PARKER, K. J., et al. Plasma oxytocin concentrations and OXTR polymorphisms predict social impairments in children with and without autism spectrum disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 33, p. 12258–12263, 2014.

PATTERSON, P. H. Modeling autistic features in animals. **Pediatric Research**, v. 69, n. 5, p. 1–14, 2011.

- PORTFORS, C. V.; PERKEL, D. J. The role of ultrasonic vocalizations in mouse communication. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 28, p. 115–120, 2014.
- RACICOT, K., et al. Understanding the Complexity of the Immune System during Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 2, p. 107–116, 2014.
- RATNAYAKE, U., et al. Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. 180, 2013.
- REGER, M.A., et al. Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. **Neurology**, v. 70, p. 440—448, 2008.
- ROWE, J. H., et al. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 102–106, 2012.
- SCHEDLOWSKI, M.; ENGLER, H.; GRIGOLEIT, J. S. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 35, p. 1–8, 2014.
- SCHWARTING, R. K. W.; WÖHR, M. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 337–348, 2012.
- SCHWARTZER, J. J., et al. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 3, 2013.
- SERVADIO, M., et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 9, 2016.
- SHARMA, S. R.; GONDA, X.; TARAZI, F. I. Autism spectrum disorder: classification, diagnosis and therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 190, p. 91–104, 2018.
- SILVERMAN, J. L., et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 490–502, 2010.
- SOLEK, C. M., et al. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. **Developmental Dynamics**, v. 247, n. 4, p. 588–619, 2018.
- SPENCE, H. R., et al. Vocal coselection in rat pup ultrasonic vocalizations. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 7, p. 1922–1929, 2016.
- SPERDIN, H.F., et al. Early alterations of social brain networks in young children with autism. **eLife science**, v. 7, e31670, 2018.

TANAKA, A., et al. Delivery of oxytocin to the brain for the treatment of autism spectrum disorder by nasal application. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1105–1111, 2018.

TAKSANDE B.G., et al. Agmatine attenuates lipopolysaccharide induced anorexia and sickness behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 132, p. 108-114, 2015.

TANSEY, K. E., et al. Oxytocin receptor (OXTR) does not play a major role in the aetiology of autism: genetic and molecular studies. **Neuroscience Letters**, v. 474, n. 3, p. 163–167, 2010.

TAYLOR, P. V., et al. Sexually dimorphic effects of a prenatal immune challenge on social play and vasopressin expression in juvenile rats. **Biology of Sex Differences**, v. 3, n. 1, p. 15, 2012.

TERRY, L. M.; JOHANSON, I. B. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. **Developmental Psychobiology**, v. 29, n. 4, p. 353–377, 1996.

THION, M. S.; GAREL, S. On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 47, p. 121–130, 2017.

THOMPSON, R., et al. The effects of vasopressin on human facial responses related to social communication. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, p. 35-48, 2004.

URAKUBO, A., et al. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophrenia Research**, v. 47, n. 1, p. 27–36, 2001.

VANDERSCHUREN, L. J.; NIESINK, R. J.; VAN REE, J. M. The neurobiology of social play behavior in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 3, p. 309–326, 1997.

VAN MOURIK, M. S. M.; MACKLON, N. S.; HEIJNEN, C. J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 1, p. 4–19, 2008.

VAN WIMERSMA, T. B., et al. Neurohypophyseal hormones and excessive grooming behaviour. **European Journal of Pharmacology**, v. 187, n. 1, p. 1–8, 1990.

VIEIRA, F. **Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo como modelo translacional de transtorno do espectro autista**. 2017. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2017.

WANG, H., et al. Maternal LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

WILLEY, A. R.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Social interactions and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 1, p. 122–129, 2009.

WÖHR M. Ultrasonic vocalizations in Shank mouse models for autism spectrum disorders: detailed spectrographic analyses and developmental profiles. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 43, p. 199–212, 2014.