



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Efectos de la dieta materna alta en grasa en el desarrollo de la corteza cerebral**

POR

Ramón Carrazana Escalona

Tutor: Dr. Ariel Ávila

Co- Tutora: Dra. Lorena Mardones

Evaluador externo: Dr. Carlos Escudero

Evaluador interno: Dr. Felipe Albarrán

**2024**

**Concepción, Chile**

## Acta de tesis

---

Dr. Ariel Ávila  
Tutor  
Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC)

---

Dra. Lorena Mardones  
Co- Tutora  
Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC)

---

Dr. Carlos Escudero  
Evaluador externo  
Universidad del Biobío (UBB)

---

Dr. Felipe Albarrán  
Evaluador interno  
Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC)

## Resumen.

**Introducción:** La obesidad es un problema de salud mundial que afecta la vida humana desde el útero. Las consecuencias del desarrollo neurológico para un hijo de madre obesa pueden incluir trastornos alimentarios, alteraciones del comportamiento y problemas de aprendizaje. En este trabajo se evaluaron en detalle los eventos celulares que ocurren durante las primeras etapas del desarrollo de la corteza cerebral en respuesta a una dieta materna rica en grasas (mHFD, por sus siglas en inglés). **Objetivo general:** Analizar las consecuencias de un tratamiento agudo y crónico con una mHFD para el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria. **Material y métodos:** Se expusieron ratones hembra C57/BL6 a mHFD o a una dieta de control durante tres periodos: 15 días desde la concepción (exposición corta), desde 1 mes antes de la concepción hasta el día embrionario 15 (E15, exposición prolongada) o 10 semanas antes de la concepción hasta E15 (exposición crónica). Se realizó inmunohistoquímica en E13 y E15 para analizar la dinámica de las células progenitoras y la neurogénesis en la corteza cerebral, y en P14 para evaluar el resultado del proceso. Las células se contaron utilizando CellProfiler en el plano más brillante a lo largo de la pila Z. **Resultados:** La exposición a mHFD causó una disminución de progenitores intermedios (IP) en E13 en ambos sexos, con una reducción de neuronas recién generadas (NN) en los machos. En E15, las NN también disminuyeron en las hembras, junto con un defecto mayor en la neurogénesis. A nivel posnatal (P14), se observó una disminución en las neuronas excitadoras TBR1+ y SATB2+ en la corteza. La exposición prolongada (1 mes) a mHFD tuvo efectos más pronunciados, disminuyendo tanto los progenitores apicales como los IP en hembras. La exposición crónica (10 semanas antes de la concepción) afectó a ambos sexos, reduciendo las células TBR1+. Además, se observó una disminución de interneuronas somatostatina (SST) en ambos sexos y un aumento de interneuronas parvalbúmina (PV). **Discusión:** Este estudio demuestra que la mHFD altera el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria al afectar la dinámica de las células progenitoras y la generación de interneuronas, lo que conduce a una estructura celular cortical anormal dos semanas después del nacimiento. La exposición previa a mHFD antes del embarazo tiene efectos adicionales. **Conclusión:** La mHFD altera la neurogénesis en la descendencia de forma diferencial según el sexo y el tiempo de exposición, afectando tanto a las neuronas excitadoras como a las interneuronas.

**Palabras claves:** neurogénesis, dieta materna alta en grasa, corteza cerebral.

## Abstract.

**Introduction:** Obesity is a global health problem that affects human life from the womb. The neurodevelopmental consequences for a child of an obese mother may include eating disorders, behavioral alterations, and learning problems. In this study, we detailed the cellular events occurring during the initial stages of cortical development in response to a maternal high-fat diet (mHFD). **General Objective:** To analyze the consequences of acute and chronic treatment with mHFD on the development of the embryonic cerebral cortex. **Methods:** C57/BL6 female mice were exposed to mHFD or a control diet during three periods: 15 days from conception (short exposure), from 1 month before conception to embryonic day 15 (E15, prolonged exposure), or 10 weeks before conception to E15 (chronic exposure). Immunohistochemistry was performed on E13 and E15 to analyze progenitor cell dynamics and neurogenesis in the cerebral cortex, and at P14 to evaluate the outcome of the process. Cells were counted using CellProfiler on the brightest plane along the Z-stack. **Results:** Exposure to mHFD caused a decrease in intermediate progenitors (IP) on E13 in both sexes, with a reduction in newly generated neurons (NN) in males. By E15, NN also decreased in females, along with a greater defect in neurogenesis. At postnatal day 14 (P14), a decrease in TBR1+ and SATB2+ excitatory neurons was observed in the cortex. Prolonged exposure (1 month) to mHFD had more pronounced effects, decreasing both apical progenitors and IP in females. Chronic exposure (10 weeks before conception) affected both sexes, reducing TBR1+ cells. Additionally, a decrease in somatostatin (SST) interneurons and an increase in parvalbumin (PV) interneurons were observed in both sexes. **Discussion:** This study demonstrates that mHFD alters the development of the embryonic cerebral cortex by affecting progenitor cell dynamics and interneuron generation, leading to an abnormal cortical cellular structure two weeks after birth. Prior exposure to mHFD before pregnancy has additional effects. **Conclusion:** mHFD alters neurogenesis in the offspring in a sex- and exposure time-dependent manner, affecting both excitatory neurons and interneurons.

**Key words:** neurogenesis, high-fat diet, cerebral cortex

# Índice

Índice.....	5
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Introducción.....	9
Obesidad.....	9
Obesidad y embarazo.....	10
Desarrollo de la corteza cerebral.....	11
Neuronas Inhibitorias.....	14
Migración neuronal.....	15
Efectos de una dieta alta en grasas para el desarrollo de la corteza cerebral.....	16
Diferencias dependientes del sexo en el desarrollo cerebral prenatal.....	18
<i>Diferencias neuroanatómicas durante el desarrollo prenatal.....</i>	18
<i>Acciones diferenciales de las hormonas durante el desarrollo prenatal.....</i>	19
<i>Efectos diferenciales de la activación inmunitaria durante el desarrollo prenatal.....</i>	20
<i>Modificaciones epigenéticas específicas por sexo durante el desarrollo prenatal.....</i>	21
Hipótesis.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
Metodología.....	25
Animales.....	25
Protocolo experimental.....	25
Extracción, fijación del cerebro y crio secciones.....	31
Genotipado de sexo.....	31
Inmunohistoquímica.....	31
Toma de imágenes y Procesamiento de Imágenes.....	33
Cálculo del ángulo de división de los AP.....	34
Determinaciones de metabolitos por métodos espectrofotométricos.....	34
Triglicéridos en suero.....	34
Colesterol LDL en suero.....	34
Niveles de glucosa en suero.....	35
Niveles de citocinas en la placenta.....	35
Insulina.....	35
Análisis estadístico.....	36
Resultados.....	37
La dieta alta en grasa materna altera la dinámica de la corteza en desarrollo.....	37
La dieta alta en grasa materna altera la dinámica de los progenitores ubicados en el subpallium.....	47

Los efectos de la dieta alta en grasa materna se manifiestan al nacer con la alteración del tamaño y distribución de las poblaciones neuronales.....	49
Los efectos de una mHFD sobre el desarrollo de la corteza cerebral de la descendencia dependen del tiempo de exposición a esta. ....	53
Diez semanas de tratamiento con una HFD previos al embarazo aumentan los efectos observados sobre el desarrollo de la corteza cerebral .....	58
La mHFD afecta el peso de la placenta y el cerebro dependiendo del tiempo de exposición.....	61
HFD y estado inflamatorio .....	63
Discusión.....	69
La dieta materna alta en grasa altera la neurogénesis de la descendencia .....	69
Interneuronas .....	73
Los efectos sobre la neurogénesis de una mHFD difieren en cuanto al tiempo de exposición. ....	74
La mHFD altera el estado inflamatorio de la placenta.....	77
La dieta materna alta en grasa tiene un efecto diferencial en cuanto al sexo de la descendencia .....	78
Conclusión y proyecciones.....	80
Bibliografía.....	81

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Proceso de neurogénesis cortical en el ratón. ....	13
<b>Figura 2.</b> Diseño experimental implementado.....	27
<b>Figura 3.</b> La dieta alta en grasa materna altera la dinámica celular de los progenitores y la neurogénesis al E13. ....	38
<b>Figura 4.</b> La mHFD modifica el ángulo de división en los machos aumentando la tasa de divisiones simétricas de los AP. ....	41
<b>Figura 5.</b> La mHFD altera a los progenitores intermediarios al E15. ....	43
<b>Figura 6.</b> Una mHFD afecta la morfología cerebral al día E15 .....	46
<b>Figura 7.</b> La dieta materna alta en grasa altera la proliferación de células en la eminencia media tanto en E13 como E15.....	48
<b>Figura 8.</b> La dieta materna alta en grasa modifica el número de células excitatorias presentes en la corteza cerebral de la descendencia en el P14.....	50
<b>Figura 9.</b> La dieta materna alta en grasa modifica el número de interneuronas presentes en la corteza cerebral de la descendencia en el período posnatal. ....	52
<b>Figura 10.</b> La exposición prolongada (1 mes antes de la estera) a un mHFD altera adicionalmente la dinámica de las células progenitoras y la neurogénesis en E15 .....	54
<b>Figura 11.</b> Una MHFD prolongada 1 mes antes del apareamiento afecta la morfología cerebral al día E15. ....	57
<b>Figura 12.</b> La exposición prolongada a una dieta materna alta en grasa por 10 semanas antes del embarazo altera la dinámica de los progenitores y la generación de nuevas neuronas. ....	59
<b>Figura 13.</b> La dieta alta en grasa materna altera el peso placentario y del cerebro de la descendencia. ....	62
<b>Figura 14.</b> Citocinas en suero materno de la intervención aguda (15 días). ....	64
<b>Figura 15.</b> Niveles de citoquinas en la placenta. ....	66

## Índice de tablas

<b>Tabla I.</b> Ingredientes de la dieta de los ratones según indica la compañía ResearchDiet. ....	28
<b>Tabla II.</b> Desglose de la composición de la dieta según macromoléculas principales. ....	28
<b>Tabla III.</b> Marcadores utilizados en inmunohistoquímica.....	30
<b>Tabla IV.</b> La mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E13.....	39
<b>Tabla V.</b> La mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E15. ....	44
<b>Tabla VI.</b> La exposición prolongada (1 mes antes del apareamiento) a una mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E15.....	55
<b>Tabla VII.</b> La exposición prolongada (10 semanas antes del apareamiento) a una mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E15.....	60
<b>Tabla VIII.</b> Analítica de suero materno.....	68

## Introducción

### Obesidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad mundial se ha triplicado desde 1975. En 2016, más de 1.9 mil millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos (*Obesity and Overweight*, s. f.). Esta tendencia ascendente es alarmante y refleja un problema de salud pública que transcurre a través de las fronteras nacionales y culturales. En el año 2000 la Organización Mundial de la Salud declaró a la obesidad como una epidemia global («Obesity», 2000). A pesar del esfuerzo realizado, la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso en la población mundial no ha hecho más que seguir aumentando de forma sostenida. A nivel mundial la proporción de adultos con índice de masa corporal (IMC) de 25 kg/m<sup>2</sup> o más se incrementó entre 1980 y 2013 desde 28,8% a 36,9% en hombres y de 29,8% a 38,0% en mujeres (Ng et al., 2014). Aunque existe un incremento en la prevalencia de la obesidad a nivel mundial, la prevalencia se distribuye desigualmente entre las distintas regiones del globo. La prevalencia de la obesidad se ha mantenido estable en los países con mayores ingresos, aunque ninguno ha podido reducirla, mientras los países con un incremento dramático del sobrepeso y obesidad se concentran en el sudeste asiático, Latinoamérica y el Caribe, países mayoritariamente en vías de desarrollo.

Por su parte, Chile lidera en el ranking de obesidad según OCDE. Así mismo, la encuesta nacional de salud del 2016-2017 declaró que el 74,2% de los mayores de 15 años presentan una malnutrición por exceso, observándose en los últimos 13 años un aumento de alrededor de 4 kilos en los hombres y 4,3 kilos en las mujeres (Ministerio de Salud, 2018). Estas cifras están en concordancia con lo observado en la encuesta de consumo alimentario en Chile del año 2010, en la cual solo el 5,9% de la población cumple con el Índice de alimentación saludable (*ENCUESTA DE CONSUMO ALIMENTARIO EN CHILE (ENCA)*, s. f.). Este problema no solo afecta a ambos sexos, sino también a todas las edades (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2017). Modelos de regresión lineal predicen que para el 2030 el 51% de la población mundial será obesa, y un 41% presentará una obesidad severa, esto constituye un incremento del 33% de la obesidad y de un 130% de la obesidad severa para el 2030 (Finkelstein et al., 2012). La epidemia de obesidad se atribuye al ambiente obesogénico moderno donde existe un aumento de la ingesta sumado a una tendencia al sedentarismo de las personas; resulta en un balance positivo para el aumento de peso (Kirk et al., 2010; Swinburn et al., 1999). El perfil de obesidad en Chile es el resultado de múltiples factores, similares a las tendencias globales. En primer lugar, es importante considerar la predisposición genética a la obesidad. Aunque este aspecto no es específico de Chile, estudios genéticos han demostrado que ciertas variantes en el ADN pueden aumentar la susceptibilidad de una persona a acumular grasa corporal. Se menciona que las variantes en genes como el FTO está relacionado con el exceso de peso en la población pediátrica de chilenos amerindios (Riffo et al., 2012). El estilo de vida, especialmente la dieta y la actividad física, constituye un segundo factor crucial en la prevalencia de la obesidad en Chile. El país ha atravesado una significativa transición nutricional caracterizada por un aumento en el consumo de alimentos procesados y bebidas azucaradas, al tiempo que se ha observado una reducción en la

ingesta de productos frescos y nutritivos. Un informe de la FAO destaca que Chile figura entre los países con el mayor consumo per cápita de bebidas azucaradas en América Latina. Adicionalmente, la Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 reveló que solo un 15% de la población adulta cumple con las recomendaciones de actividad física semanal, factor que contribuye de manera significativa a las elevadas tasas de sobrepeso y obesidad en la nación. En este contexto, se ha registrado un incremento notable en el consumo de comidas rápidas y bebidas azucaradas, fenómeno influenciado por la globalización y la adopción de dietas occidentalizadas. Investigaciones recientes correlacionan directamente el consumo de estos productos con un incremento en las tasas de obesidad entre la población chilena (Corvalán et al., 2013). El entorno social y económico también juega un papel crucial en la predisposición a la obesidad. Existen desigualdades significativas en la prevalencia de obesidad en diferentes grupos socioeconómicos en Chile. Según la Encuesta Nacional de Salud, la prevalencia de obesidad es mayor en grupos con menor nivel educativo y en hogares con ingresos más bajos. Estos datos indican que el acceso limitado a alimentos saludables y oportunidades de actividad física en comunidades de bajos ingresos puede aumentar el riesgo de obesidad. Además, la urbanización ha impactado en los patrones de vida que predisponen a la obesidad. Las áreas urbanas tienden a promover estilos de vida sedentarios y un mayor acceso a alimentos calóricos y de bajo valor nutritivo. Un estudio sobre el impacto de la urbanización en la salud en América Latina señala que las ciudades chilenas, como Santiago, exhiben tasas más altas de obesidad en comparación con zonas menos urbanizadas del país (Vásquez et al., 2017). La urbanización y el aumento del transporte motorizado han reducido significativamente los niveles de actividad física. La Encuesta Nacional de Salud también destacó que más del 80% de la población chilena es sedentaria (Ministerio de Salud de Chile, 2017). En respuesta a estos desafíos, el gobierno chileno ha implementado políticas públicas para combatir la obesidad. Un ejemplo notable es la Ley de Etiquetado y Publicidad de Alimentos, que exige etiquetas de advertencia en alimentos altos en calorías, azúcares, sodio y grasas saturadas. Además, se han promovido programas para aumentar la actividad física en las escuelas y comunidades. Estudios en humanos concluyeron que una dieta con más del 30% de la energía proveniente de las grasas puede fácilmente provocar obesidad (Bray & Popkin, 1998). Similares resultados se han encontrado en diversos modelos murinos. Tanto en ratas como ratones, se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de grasa en la dieta y el incremento en la ganancia de peso (Hariri & Thibault, 2010).

### **Obesidad y embarazo**

La malnutrición por exceso durante la gestación es especialmente problemática porque la obesidad materna o sobre nutrición es uno de los factores que contribuye a un mal desarrollo y resultado del embarazo, afectando negativamente al crecimiento embrionario y fetal, que también puede tener consecuencias duraderas en la salud del recién nacido. En los últimos años se ha resaltado la importancia de la relación entre el ambiente intrauterino, así como el desarrollo fetal y perinatal, con el mayor riesgo de padecer enfermedades metabólicas en la edad adulta. Un estudio publicado en 2018 analizó la prevalencia de obesidad y el sobrepeso en mujeres embarazadas entre los años 2005 y 2014 en el mundo. Este estudio estimó que en el año 2014 existían 38,9 millones de embarazadas con sobrepeso y obesidad. Además, los autores mostraron que el sobrepeso y la obesidad durante el embarazo se ha incrementado en países con ingresos medio y alto (C. Chen et al., 2018). La obesidad durante

el embarazo se asocia con resultados clínicos desfavorables tanto para la madre como para el hijo. No solo la probabilidad de embarazarse se reduce linealmente a partir de un IMC superior a 29 kg/m<sup>2</sup>, sino que los riesgos asociados a la obesidad durante el embarazo están también linealmente asociados con el IMC (Stubert et al., 2018). La obesidad materna es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes gestacional y los trastornos hipertensivos gestacionales, además de estar asociados con un riesgo incrementado de obesidad en la descendencia (Heslehurst et al., 2019).

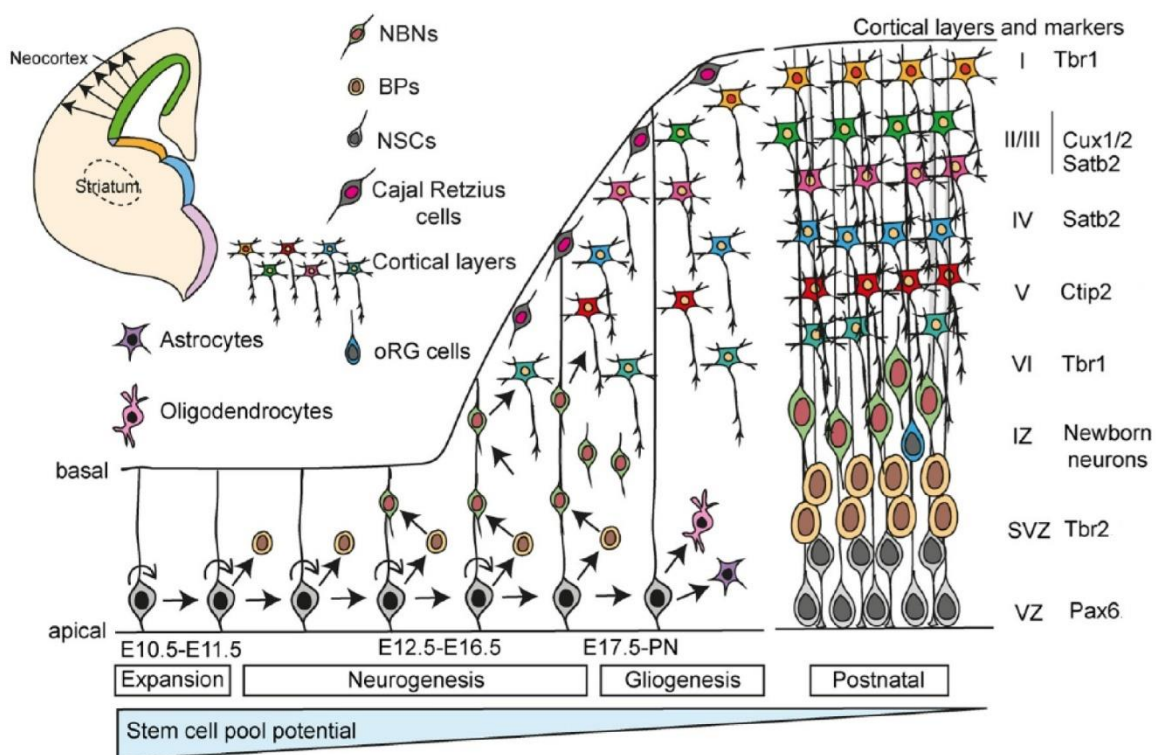
En cuanto a los efectos de la obesidad para la descendencia, se ha sugerido que el incremento del peso observado en la descendencia de mujeres obesas está asociado con hiperfagia anterior a la ganancia de peso, lo que implicaría una desregulación central de la homeostasis energética, señalando al hipotálamo como una de sus posibles causas (Dearden et al., 2020; Dearden & Ozanne, 2015). Los hallazgos encontrados por Dearden et al señalan que la obesidad materna altera la firma molecular del hipotálamo en desarrollo. Asociando esto con una interrupción del crecimiento y desarrollo de los neuro progenitores del hipotálamo. Fetos de madres obesas mostraron además resistencia a la insulina en el hipotálamo, que puede ser la causa de la proliferación reducida observada en esta estructura. Además, se demostró que la obesidad materna activó la vía de señalización de la insulina en el hipotálamo de la descendencia durante el período neonatal, resultando en una neurogénesis disminuida (Dearden et al., 2020). Asimismo, existe evidencia proveniente de estudios en animales y humanos que sugieren que la obesidad materna programa a la descendencia hacia la hiperglucemia, diabetes, hipertensión e incluso hacia enfermedades renales (Glastras et al., 2018). No hay mucha información sobre cómo la obesidad materna, que implica riesgos obstétricos y enfermedades frecuentes como las del síndrome metabólico, afecta al neurodesarrollo de la descendencia. Algunos reportes encontrados en la literatura han asociado la obesidad y el sobrepeso durante el embarazo con trastornos del desarrollo cognitivo, problemas del comportamiento, y además de un riesgo incrementado de obtener ser diagnosticado con una enfermedad psiquiátrica (Rajasilta et al., 2021; Tong & Kalish, 2021).

### **Desarrollo de la corteza cerebral**

La corteza cerebral es la capa más externa del cerebro y es responsable de muchas de las funciones cognitivas superiores, como la percepción, la atención, la conciencia, el pensamiento, el lenguaje y la memoria. En ratones, el desarrollo de la corteza cerebral comienza en el embrión y continúa después del nacimiento. El desarrollo cortical en ratones se puede dividir en cuatro etapas principales: la neurogénesis, la migración neuronal, la diferenciación neuronal y la sinaptogénesis (Flórez et al., 2018). Así, las células nerviosas se dividen y se sitúan en la corteza cerebral. Después, estas células nerviosas se enlazan para crear circuitos neuronales complejos que hacen posibles las funciones cognitivas. El desarrollo de la corteza cerebral en ratones es un proceso complejo que depende de muchos genes y factores ambientales. El estudio del desarrollo de la corteza cerebral en ratones puede mejorar nuestro conocimiento del cerebro humano y cómo curar enfermedades neurológicas.

La neurogénesis (Figura 1) es el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células progenitoras. En el ratón, la neurogénesis cortical tiene lugar desde el día embrionario 9 (E10) hasta el día postnatal 2 (P2). En el E9 se produce la expansión de la parte más anterior del tubo neural, que origina dos vesículas llamadas vesículas telencefálicas. La mitad dorsal de estas vesículas, formada por una capa única de células madre neuroepiteliales (NECs), será el primordio de la corteza cerebral, que dará lugar a la corteza cerebral. Las NECs extienden 2 procesos desde el núcleo en dirección radial: uno contactando con la superficie apical del neuroepitelio (la superficie interna de las vesículas) y la otra contactando con la lámina basal. Son células muy polarizadas que se mantienen unidas entre sí por uniones adherentes y estrechas a nivel del dominio apical (Fernández et al., 2016; Sidman & Rakic, 1973). Después de algunas rondas de división celular y amplificación, las NEC pierden uniones celulares mientras conservan las uniones adherentes apicales, y se convierten en células gliales radiales apicales (aRGC). Las aRGC son el principal tipo de célula progenitora cortical, que se divide en la superficie apical y se caracterizan por expresar el factor de transcripción de caja pareada 6 (PAX6) y su linaje da lugar a todas neuronas excitadoras corticales (Malatesta et al., 2000). De hecho, la aparición de aRGCs marca el inicio de la neurogénesis cortical. Al inicio de la neurogénesis (alrededor del día embrionario E11 en ratón), la mayoría de las divisiones de las aRGC producen aRGC adicionales (autoamplificación) y, en una pequeña proporción, neuronas. A medida que avanza el desarrollo, la tasa de autoamplificación de aRGC disminuye concomitantemente con un aumento en las divisiones asimétricas para generar células progenitoras secundarias o progenitores intermediarios (IP) que expresan el factor de transcripción TBR2 y neuronas que expresan TBR1 (Englund et al., 2005; Sessa et al., 2008). Durante este período, las células progenitoras se localizan en la zona ventricular (VZ) y la zona subventricular (SVZ) del tubo neural (Mira & Morante, 2020). Mientras las RGCs son las principales responsables de generar las neuronas corticales, los IPs contribuyen a la expansión de la población neuronal y a la diversidad celular (Arellano et al., 2021). La neurogénesis cortical se produce de forma secuencial, siguiendo un orden temporal y espacial que determina la identidad y la posición de las neuronas corticales. Así, las primeras neuronas que se generan son las que forman la capa VI, seguidas por las de la capa V, IV, III y II, respectivamente. Este orden se conoce como el principio de adentro hacia afuera, y se debe a que las neuronas más jóvenes migran por encima de las más viejas para alcanzar su destino final (Cooper, 2008). La especificación de las neuronas corticales depende de la expresión de factores de transcripción que definen su fenotipo y su función. Algunos de estos factores son PAX6, EMX2, COUP-TF1, FOXG1, TBR1, TBR2, CTIP2, SATB2 Y CUX1, entre otros. Estos factores se regulan por mecanismos intrínsecos, como el momento de la división celular, el modo de división, el tamaño del dominio de expresión y las interacciones proteína-proteína, y por mecanismos extrínsecos, como las señales morfogenéticas, las señales neurotróficas, las señales eléctricas y las señales epigenéticas (Studer, 2011). PAX6 es un factor de transcripción altamente conservado que contiene dos dominios de unión al ADN, un dominio pareado (PD) y un homodominio de tipo pareado (HD), y es crucial para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), ojos, nariz, páncreas y glándula pituitaria. En la corteza cerebral en desarrollo, PAX6 es expresado por las glías radiales (Osumi et al., 2008). En cambio, TBR2, un factor de transcripción T-box, se expresa específicamente en los progenitores intermediarios que derivan de las glías radiales y son consideradas amplificadoras de la neurogénesis (Hevner, 2019).

La neurogénesis cortical también se ve influenciada por la simetría y la asimetría de las divisiones celulares, que determinan el número y el tipo de células hijas que se producen. La simetría se refiere a que las dos células hijas tienen el mismo destino, mientras que la asimetría se refiere a que las dos células hijas tienen destinos diferentes (Alvarez-Buylla et al., 2001; Belmonte-Mateos & Pujades, 2022). La fosforilación de la histona H3 en el residuo de serina 10 (PHH3) se considera un marcador de tránsito de G2 a M (Sawicka & Seiser, 2012), por lo que es utilizada para visualizar aquellas células que se encuentran en división celular. El modo de división celular se modula por la orientación del huso mitótico, que depende de la polaridad celular, el citoesqueleto, el centrosoma y las moléculas de adhesión. La orientación del huso mitótico puede ser paralela, perpendicular u oblicua al plano ventricular, lo que influye en el ángulo de división celular y en el destino de las células hijas (LaMonica et al., 2013; Lin et al., 2021; Matsuzaki & Shitamukai, 2015).



**Figura 1. Proceso de neurogénesis cortical en el ratón.** Tomado de Mukhtar and Taylor 2018 (Mukhtar & Taylor, 2018).

La neurogénesis cortical se puede dividir en dos fases: una fase temprana, que ocurre entre E10 y E14, y una fase tardía, que ocurre entre E15 y P2. Durante la fase temprana, predominan las divisiones simétricas radiales, que generan más RGCs y aumentan el grosor de la VZ. Durante la fase tardía, predominan las divisiones asimétricas radiales, que generan más IPCs y neuronas, y aumentan el grosor de la SVZ. La transición entre las dos fases se debe a cambios en la expresión de genes, en la señalización celular y en la orientación del huso

mitótico (Dwyer et al., 2016; Li et al., 2021). La neurogénesis cortical se acompaña de la formación de la zona marginal (MZ), la capa subplate (SP) y la capa cortical (CP), que son las principales regiones que componen la corteza cerebral. La MZ se forma por la acumulación de células Cajal-Retzius, que secretan la proteína Reelina, que es esencial para la migración y la laminación de las neuronas corticales (Flores Cruz & Escobar, 2011; Tissir et al., 2002). La SP se forma por la llegada de las primeras neuronas corticales, que establecen conexiones con las aferencias talámicas y corticales (Flores Cruz & Escobar, 2011). La CP se forma por la llegada de las neuronas corticales posteriores, que se organizan en seis capas según el principio de adentro hacia afuera.

### **Neuronas Inhibitorias**

La neurogénesis cortical también implica la generación de neuronas inhibitorias, que se originan en la zona ganglionar ventral (VZG) y la zona ganglionar dorsal (ZGD) del prosencéfalo, y migran tangencialmente hacia la corteza cerebral. Estas neuronas expresan marcadores como DLX, GAD, NKX2.1, LHX6 y SST, entre otros, y se integran en la CP y la SP, donde modulan la actividad y la plasticidad de las neuronas excitadoras. Las interneuronas GABAérgicas son una familia diversa que puede clasificarse por su morfología, propiedades electrofisiológicas o marcadores histológicos (Ferguson & Gao, 2018; Markram et al., 2004). La diversidad de interneuronas parece surgir a través de la implementación de programas genéticos intrínsecos a las células progenitoras, que se desarrollan durante un período prolongado de tiempo hasta que las interneuronas adquieren características maduras. La trayectoria de desarrollo de las interneuronas también está modulada por mecanismos autónomos no celulares dependientes de la actividad que influyen en su capacidad para integrarse en circuitos nacientes y esculpir su distribución final en la corteza cerebral adulta (Lim et al., 2018). La nomenclatura más común segrega las interneuronas en tres tipos: parvalbúmina (PV), somatostatina (SST) y receptor ionotrópico de serotonina 5HT<sub>3a</sub> (5HT<sub>3aR</sub>), según las proteínas características que expresan las interneuronas (Rudy et al., 2011). El subtipo más común, las interneuronas PV, son conocidas por su fenotipo de fast-spiking, la baja resistencia de entrada (input resistance) y post-hiperpolarización rápida de alta amplitud (Kawaguchi & Kubota, 1997). La segunda clase de interneuronas se caracteriza por la expresión del neuropéptido somatostatina (SST) y la orientación preferencial dendrítica de sus sinapsis (Xu et al., 2006). El subpalo embrionario genera todas las neuronas GABAérgicas en el telencéfalo. Las neuronas de proyección GABAérgicas son particularmente abundantes en el cuerpo estriado, el globo pálido, la amígdala central y el tabique, pero las neuronas de proyección de largo alcance, como la neurona SST<sup>+</sup>/NOS<sup>+</sup>, también están presentes en la neocorteza y otras regiones corticales (Lübke et al., 2015). Poco después de que las células progenitoras se dividen, las células posmitóticas sufren una larga migración tangencial y alcanzan el palio a través de varias corrientes estereotipadas. Las interneuronas continúan dispersándose por la corteza en desarrollo utilizando las mismas rutas migratorias hasta que las abandonan para adoptar su posición final dentro de una región y capa de la corteza. Las interneuronas adquieren gradualmente sus marcadores bioquímicos durante este proceso, aunque muy a menudo no exhiben su morfología y conexiones características hasta etapas relativamente tardías del desarrollo posnatal. El largo retraso que existe entre el momento en que nacen las interneuronas y el momento en que comienzan a mostrar sus características maduras ha dado lugar a opiniones

muy divergentes sobre los mecanismos que controlan la generación de su diversidad (Lim et al., 2018; Wamsley & Fishell, 2017).

### **Migración neuronal**

La migración neuronal es el proceso de desplazamiento de las neuronas desde su lugar de origen hasta su lugar de destino. En el ratón, la migración neuronal cortical ocurre entre E11 y P10, y se puede clasificar en dos tipos: radial y tangencial. La migración radial se refiere al movimiento de las neuronas a lo largo del eje ventricular-pial, siguiendo el prolongamiento radial de las RGCs. La migración tangencial se refiere al movimiento de las neuronas a lo largo del eje rostro-caudal o medio-lateral, sin seguir el prolongamiento radial de las RGCs. La migración radial es el principal modo de migración de las neuronas corticales excitadoras, que se originan en la VZ y la SVZ, y se dirigen hacia la CP. La migración tangencial es el principal modo de migración de las neuronas corticales inhibitorias, que se originan en la VZG y la ZGD, y se dirigen hacia la CP y la SP (Buchsbaum & Cappello, 2019; Keays, 2007). La migración neuronal depende de la interacción de las neuronas con el entorno extracelular, que incluye la matriz extracelular (MEC), las moléculas de adhesión celular (MAC) y las señales químicas y eléctricas. La MEC es un conjunto de proteínas y glicoproteínas que se encuentran en el espacio intercelular, y que proveen de soporte estructural y funcional a las células. Algunas de las proteínas de la MEC que participan en la migración neuronal son la laminina, la fibronectina, el colágeno, la tenascina, la nidogén y la Reelina, entre otras. Estas proteínas se unen a receptores de la superficie celular, como las integrinas, los distroglicanos y los receptores de Reelina (VLDLR y ApoER2), que activan vías de señalización intracelular que regulan el citoesqueleto, la polaridad celular, la motilidad celular y la expresión génica. Las MAC son un conjunto de proteínas que se encuentran en la membrana plasmática, y que median la adhesión y la comunicación entre las células. Algunas de las MAC que participan en la migración neuronal son la N-CAM, la L1, la N-cadherina, la E-cadherina, la protocadherina, la NCAM2, la TAG-1 y la Nr-CAM, entre otras. Estas proteínas se unen a otras proteínas de la misma célula (adhesión homofílica) o de otra célula (adhesión heterofílica), y modulan la adhesión celular, la transducción de señales, la remodelación del citoesqueleto y la diferenciación celular (Broadie et al., 2011; Jakovcevski et al., 2023).

Las señales químicas y eléctricas son un conjunto de moléculas y corrientes que se difunden en el medio extracelular, y que actúan como atractantes o repelentes para las neuronas migratorias. Algunas de las señales químicas que participan en la migración neuronal son los factores de crecimiento, las citoquinas, los neurotransmisores, los neuropéptidos y los morfógenos, entre otros. Estas moléculas se unen a receptores específicos de la membrana celular, como los receptores tirosina quinasa, los receptores acoplados a proteínas G, los receptores ionotrópicos y los receptores nucleares, que desencadenan cascadas de señalización intracelular que afectan la polaridad celular, la motilidad celular, la supervivencia celular y la expresión génica. Las señales eléctricas que participan en la migración neuronal son las corrientes iónicas que se generan por la actividad de los canales y los transportadores iónicos, que modulan el potencial de membrana y la excitabilidad de las neuronas migratorias (Avila et al., 2014; Avila, Nguyen, et al., 2013; Avila, Vidal, et al., 2013; Faber & Pereda, 2018; Khodosevich & Monyer, 2011). La migración neuronal también depende de la dinámica del

citoesqueleto, que es el conjunto de filamentos y proteínas asociadas que se encuentran en el citoplasma, y que determinan la forma, el movimiento y la división de las células (Avila, Vidal, et al., 2013).

### **Efectos de una dieta alta en grasas para el desarrollo de la corteza cerebral.**

Considerando los procesos complejos de la neurogénesis cortical que involucran proliferación y diferenciación; y los trastornos metabólicos e inflamatorios de la dieta materna alta en grasa durante el embarazo, cabe preguntarlos: ¿Cuáles serían los efectos de una dieta alta en grasa materna en el desarrollo de la corteza cerebral?

En la literatura se menciona como una dieta materna rica en grasas (mHFD, por su sigla en inglés) tiene tanto efectos neurales estructurales como funcionales en la descendencia, relacionado con una disminución en el desarrollo cerebral. Un estudio, exploró la relación entre el IMC materno pre-embarazo y la conectividad funcional distal y local del cerebro neonatal encontrando que el IMC pre-embarazo y los valores ReHo (homogeneidad regional) están correlacionados positivamente, lo que sugiere un incremento en la conectividad funcional local cuando aumenta el IMC (Rajasilta et al., 2021). En modelos de animales, una mHFD se ha encontrado asociada a un incremento en la proliferación celular en el hipotálamo (Monk et al., 2013) y en la zona ventricular de la corteza cerebral (Niculescu & Lupu, 2009), zona adyacente al hipotálamo. Además, se ha descrito una apoptosis y diferenciación neuronal reducida en el giro dentado en respuesta a la HFD (Hariri & Thibault, 2010). Igualmente, se ha mencionado en la literatura que la descendencia se vuelve más susceptible a las alteraciones inflamatorias del sistema serotoninérgico, incrementando el riesgo de enfermedades mentales como ansiedad, depresión y autismo (Cortés-Albornoz et al., 2021).

En el sistema dopaminérgico de roedores, después de haber sido expuestos a una dieta alta en grasas, se encontraron modificaciones que afectaron el núcleo accumbens y el área tegmental ventral. El núcleo accumbens y el área tegmental ventral son regiones clave en la regulación de la motivación, el placer y la recompensa, y su alteración puede influir en el comportamiento alimentario y la preferencia por alimentos ricos en grasas. Además, se observó en la descendencia un incremento en el consumo de una HFD, lo que está en correlación con el hecho de que estas partes afectadas pertenecen al circuito de recompensa (Kenny, 2011; Sullivan et al., 2014). Además, se reportó que estas alteraciones en el sistema de recompensa se debieron a hipometilaciones de los promotores de genes opioides y esto se extendió a la corteza prefrontal (Cortés-Albornoz et al., 2021; Jiménez-Chillarón et al., 2012). Estos estudios están en correspondencia con un estudio que realizó un análisis proteómico de la corteza cerebral y encontró que aquellos ratones adultos que se vieron expuestos a una mHFD durante la gestación tuvieron cambios endofenotípicos distintos independiente de su dieta actual (Manousopoulou et al., 2015). Además, se conoce que una dieta materna alta en grasa reduce la expresión de BDNF en el hipocampo de las crías. BDNF juega un rol fundamental en el neurodesarrollo y en la plasticidad sináptica (Tozuka et al., 2010). La desregulación epigenética de la expresión de *Bdnf* en el cerebro de las crías parece ser heredable hasta la tercera generación (Fusco et al., 2019). Los autores proponen un mecanismo donde la disfunción del metabolismo materno lleva a la desregulación de la vía de señalización de

la insulina, causando metilación y acetilación del promotor de *Bdnf* en los ovarios maternos, lo que puede ser transferido trans generacionalmente (Fusco et al., 2019).

Por otra parte, además de las anomalías detectadas en los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos en la descendencia, también se ha sugerido que las alteraciones encontradas en el cerebro en respuesta a una mHFD pudieran deberse a una liberación alterada de hormonas metabólicas como la insulina (Richardson & Carpenter, 2007) y la leptina (Valleau & Sullivan, 2014); así como a un incremento en la liberación de citoquinas proinflamatorias por la placenta (Sureshchandra et al., 2018). Al mismo tiempo, exposición prolongada a una mHFD provoca hipoxia placentaria tanto en la placenta proveniente tanto de los machos como de las hembras (Gohir et al., 2019) produciendo citoquinas proinflamatorias y/o aumentando la permeabilidad placentaria a citoquinas presentes en sangre materna que pasarían a sangre fetal. Con respecto a esto último, se ha demostrado que la neuroinflamación provoca trastornos en la plasticidad sináptica (Di Filippo et al., 2008). En concreto, se ha demostrado inestabilidad en las espinas dendríticas y filopodios presentes en la corteza cerebral de la descendencia de ratas expuestas a una mHFD. Dicha inestabilidad existió durante la adultez donde hubo una menor densidad de espinas dendríticas incluso cuando la descendencia fue alimentada con una dieta normal luego del destete (Hatanaka et al., 2016). En un estudio se encontró que comparado con ratones con una dieta control, el tejido de la corteza cerebral de los ratones con una HFD reveló una resistencia a la insulina, evidenciado por el fallo en la activación de la Akt, S6 y GSK3B en una estimulación con insulina *ex-vivo* (Arnold et al., 2014). Sin embargo, no se investigaron los efectos de una mHFD, sino el efecto que tendría una HFD (no materna) en ratones adultos. Por tanto, teniendo en cuenta que existe un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias y alteraciones en la liberación de la insulina en modelos que utilizan una mHFD; se pudiera encontrar alteraciones similares en la corteza cerebral embrionaria.

Específicamente en el contexto de una intervención aguda con mHFD, el ácido B-hidroxibutirato, un cuerpo cetónico, en concentraciones *in vivo*, inhibe los efectos de los agonistas de los receptores inhibitorios de GABA y glicina (Pflanz et al., 2019). Se ha demostrado que la inhibición de receptores activados por ligando como el de glicina tiene efectos sobre la proliferación, migración y diferenciación durante la neurogénesis (Avila, Vidal, et al., 2013; Avila et al., 2014; Bortone & Polleux, 2009). (Avila et al., 2014), utilizando ratones knockout para el receptor de glicina mostraron al día embrionario E15 una disminución significativa de los marcadores de inmunohistoquímica como TBR2. Por tanto, un posible mecanismo donde la mHFD en periodos cortos podría contribuir sería a través de la modulación de la neurotransmisión antes de la sinaptogénesis. En contraste con lo anterior, el consumo de una mHFD desde 4 semanas antes del apareamiento lleva a desórdenes metabólicos que se acompañan de una inflamación crónica con niveles elevados de citoquinas como: interleucina 1 beta, 2, 5, 6, 10, 12, 13, 17, interferón gama y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) (Duan et al., 2018). Mediadores proinflamatorios como el TNF alfa e interferón gamma afectan negativamente la neurogénesis embrionaria a través de la inhibición de la proliferación de los progenitores neurales (Ben-Hur et al., 2003). TNF- $\alpha$  incrementa la diferenciación hacia astrocitos e inhibe la diferenciación hacia neuronas de los progenitores neurales a través de la vía de señalización JAK/STAT3, donde interviene la familia de interleucinas

6 (Lan et al., 2012). La resistencia a la insulina en madres sometida a una HFD está asociada a la vez con la activación de forkhead box protein O3a (FOXO3a), que se transloca al núcleo, donde reduce la expresión de BDNF a través de la activación de histonas desacetilasas que afecta al gen *bdnf*, esto está a la vez ligado con la disminución en el crecimiento del hipocampo en la descendencia (Fusco et al., 2019). También existe un modelo que asemeja la resistencia a la insulina que es otra de las características de una exposición crónica de una dieta alta en grasas, donde células pluripotenciales obtenidas de ratones knockout para el receptor de insulina mostraron un aumento de los marcadores de linaje neuronal (PAX6, TUBB3, ASCL1 Y OLIG2) cuando se trataron con un medio de diferenciación por 10 días. Lo que sugiere que alteraciones en la señalización de la insulina podrían afectar la diferenciación neuronal (Gupta et al., 2018). Por tanto, se sabe que la mHFD altera el desarrollo cerebral con cambios en el hipocampo y el hipotálamo. Sin embargo, a pesar de que se tiene conocimiento sobre los procesos que intervienen en el desarrollo de la corteza cerebral, aún no se comprende completamente cómo la mHFD afecta los procesos de formación de la corteza cerebral que implican la proliferación, diferenciación y migración celular.

### **Diferencias dependientes del sexo en el desarrollo cerebral prenatal**

Las diferencias dependientes del sexo en el desarrollo cerebral prenatal han sido un tema de investigación significativa, destacando cómo los factores genéticos, hormonales y ambientales influyen en el neurodesarrollo de fetos masculinos y femeninos. Esta sección tiene como objetivo resumir la comprensión actual de estas diferencias, neuroanatómicas, hormonales, epigenéticas e inmunomediadas.

#### ***Diferencias neuroanatómicas durante el desarrollo prenatal***

La investigación ha demostrado diferencias notables en la estructura cerebral entre fetos masculinos y femeninos. Un estudio que involucró a 300 embarazos únicos masculinos y 300 femeninos utilizó ultrasonografía transabdominal para medir el diámetro biparietal, la circunferencia de la cabeza, el diámetro transcerebeloso, la cisterna magna, el grosor del pliegue nucal, y las longitudes y anchuras del Cavum Septi Pellucidi (CSP) y los ventrículos laterales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños de estas estructuras entre fetos masculinos y femeninos, con CSP más ancho y ventrículos más grandes en los masculinos, indicando que las diferencias en la estructura cerebral comienzan en la vida fetal (Kavak et al. 2021). Otros estudios han respaldado estos hallazgos, señalando que el atrio ventricular cerebral fetal es más grande en fetos masculinos comparado con los femeninos (Patel et al. 1995) y estableciendo rangos de referencia para los parámetros del ventrículo lateral cerebral fetal con diferencias sexuales significativas (Ishola et al. 2016). Más recientemente, se observó que las diferencias en el desarrollo cortical relacionadas con el sexo ocurren después de las 28 semanas de gestación, con un aumento en la profundidad de la Fisura Silviana (SF), la Fisura Parieto Occipital (POF) y la Fisura Calcarina (CF) en fetos masculinos (Mappa et al. 2024). Estos hallazgos sugieren que la trayectoria del desarrollo cerebral está influenciada por el sexo, con patrones de desarrollo neuroanatómico distintos en fetos masculinos y femeninos desde la vida fetal temprana hasta la gestación tardía. Tales diferencias en las tasas de maduración cerebral también se reflejan en condiciones como la epilepsia del lóbulo temporal, donde las tasas de maduración específicas por sexo podrían explicar la

aparición diferencial y la prevalencia de lesiones en el lado izquierdo y derecho en niños y niñas. Este concepto de "maduración cerebral diferencial" sugiere que una maduración cerebral más rápida en las mujeres podría contribuir al cierre más temprano de las ventanas de desarrollo, impactando la susceptibilidad del cerebro a ciertas condiciones neurológicas (Taylor 1969; Schepanski et al. 2018). El estrés prenatal ha revelado diferencias celulares influenciadas por el sexo. Las dos regiones de la corteza prefrontal, la corteza prefrontal medial y la corteza prefrontal orbital mostraron cambios opuestos y sexualmente dimórficos en la conectividad sináptica en respuesta a la misma experiencia. Esto contrasta con los hallazgos en el hipocampo, donde se observó pérdida de número de neuronas y aumento en la densidad de espinas en ambos sexos (Mychasiuk et al. 2012). Aunque un estudio diferente reportó un efecto dimórfico sexual en el hipocampo también (Bock et al. 2011).

### ***Acciones diferenciales de las hormonas durante el desarrollo prenatal***

Las hormonas juegan un papel crítico en la diferenciación sexual del cerebro durante el desarrollo prenatal. La exposición prenatal a esteroides sexuales como la testosterona y el estrógeno influye significativamente en el desarrollo cerebral. La testosterona, convertida en estradiol en el cerebro, puede influir en la metilación del ADN y la modificación de las histonas, afectando la diferenciación neuronal y la conectividad (Menger et al. 2010). Niveles más altos de testosterona en fetos masculinos están vinculados al desarrollo de áreas asociadas con habilidades espaciales y agresión. La interacción entre factores genéticos y hormonas sexuales resulta en la diferenciación sexual del cerebro, comenzando in utero (McCarthy et al. 2009). Estas influencias hormonales pueden programar los niveles de ansiedad in utero, llevando a resultados conductuales específicos por sexo en respuesta a estresores como la pandemia de COVID-19.

Hallazgos recientes destacan el papel complejo de las hormonas sexuales en el desarrollo cerebrovascular prenatal y la aparición de trastornos del neurodesarrollo. Durante el desarrollo temprano, el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG) alcanza su máximo, sugiriendo que hormonas sexuales como la testosterona y el estrógeno son cruciales para el adecuado crecimiento vascular cerebral y la maduración de la barrera hematoencefálica (BBB). La desregulación en estos niveles hormonales ha sido implicada en condiciones como el trastorno del espectro autista (TEA) y el trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), los cuales muestran diferencias significativas de sexo en prevalencia y sintomatología. Por ejemplo, una mayor exposición prenatal a la testosterona y una expresión reducida de aromatasa están asociadas con un riesgo incrementado de TEA, afectando regiones involucradas en comportamientos sociales y comunicación (Crider et al. 2014). Por otro lado, niveles elevados de estrógeno se encuentran que mitigan los síntomas del TDAH, enfatizando el rol neuroprotector de esta hormona (Roberts et al. 2018).

Los estudios también indican que las variaciones específicas por sexo en la expresión génica influyen en las funciones cerebrovasculares, con genes diferencialmente expresados vinculados a los cromosomas X e Y desempeñando roles clave. Además, la interacción entre las hormonas sexuales y las vías de señalización clave, como VEGF y Wnt, subraya su importancia en el desarrollo vascular cerebral. La señalización de VEGF es

esencial para la angiogénesis, mientras que la señalización de Wnt es crucial para la maduración de la BBB. Estas vías son moduladas por el estrógeno y la testosterona, llevando a patrones sexualmente dismórficos en el desarrollo cerebral (Collignon et al. 2024).

### ***Efectos diferenciales de la activación inmunitaria durante el desarrollo prenatal***

La activación inmunitaria materna (MIA, por sus siglas en inglés) puede impactar significativamente en los resultados del neurodesarrollo, conduciendo a cambios específicos por sexo en el desarrollo cerebral. Se han establecido varios modelos para explorar las consecuencias de la activación inmunitaria prenatal en el desarrollo cerebral y conductual basados en la exposición gestacional materna al virus de la influenza humana, el mimético viral ácido poliínosico [Poly(I:C)], el LPS bacteriano, el agente inflamatorio trementina, o citoquinas inflamatorias seleccionadas (Meyer 2014). La exposición a Poly I:C durante la gestación conduce a alteraciones conductuales significativas dependientes del sexo en la descendencia de ratones. La descendencia masculina expuesta a Poly I:C mostró un filtrado sensoriomotor deteriorado y un comportamiento similar al de la ansiedad incrementado en comparación con las hembras, como se evidenció en las pruebas de inhibición de prepulso (PPI) y su desempeño en el laberinto elevado (Hui et al. 2018). Más recientemente, se observó que los machos expuestos entre E12 y E15 exhibían marcadas disminuciones en PPI, mientras que las hembras también mostraron reducciones en PPI pero en menor medida. A su vez, las hembras expuestas entre E11 y E16 mostraron déficits significativos en la interacción social, más pronunciados que los de los machos, quienes solo mostraron estos déficits cuando fueron expuestos entre E12 y E15 (Fujii et al. 2023).

Las citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, producidas durante la MIA, pueden cruzar la barrera placentaria y alterar la neurogénesis y la migración neuronal. Estas citoquinas permanecen elevadas durante la adultez resultando en déficits conductuales a largo plazo, a menudo más severos en machos (Hui et al. 2018). Los fetos masculinos muestran una vulnerabilidad pronunciada a estos efectos inflamatorios, correlacionando con la mayor prevalencia de trastornos del neurodesarrollo como el TEA y la esquizofrenia en hombres. Modelos en roedores y estudios epidemiológicos humanos respaldan estos hallazgos, demostrando que las infecciones maternas durante el embarazo aumentan el riesgo de TEA y esquizofrenia, con niveles elevados de citoquinas maternas vinculados a estructura y función cerebral alteradas en la descendencia, particularmente en hombres (Hui et al. 2018; Hall et al. 2023). Un estudio de Osman et al. (2024) reportó que la descendencia macho MIA mostró incrementos significativos en citoquinas como IL-6, TNF $\alpha$  y LT- $\alpha$  en la placenta, mientras que la descendencia hembra MIA no mostró estos cambios. En el cerebro fetal, los machos exhibieron niveles elevados de IL-28B e IL-25, mientras que las hembras mostraron niveles aumentados de LT- $\alpha$ . Estos hallazgos sugieren que los fetos masculinos son más vulnerables a los efectos inflamatorios de la MIA, llevando a interrupciones más pronunciadas en la neurogénesis y la migración neuronal (Osman et al. 2024). A su vez, la descendencia femenina podría verse afectada por un aumento en el estrés oxidativo (Hui et al. 2018). Adicionalmente, investigaciones indican que la MIA activa la respuesta al estrés integrado (ISR) de manera específica por sexo. La descendencia masculina MIA demuestra cambios generalizados en genes necesarios para la biogénesis de ribosomas y la traducción del ARNm, lo que lleva a una reducción en la traducción global

del ARNm y alteración en la síntesis de proteoma naciente. Este efecto es menos pronunciado en la descendencia femenina. El estudio encontró que estos cambios dependían de la producción de interleucina-17a (IL-17a) en hembras embarazadas. El bloqueo de la ISR utilizando enfoques genéticos o farmacológicos rescató a la descendencia masculina de anomalías conductuales asociadas a MIA, destacando una vulnerabilidad específica por sexo a la activación de la ISR en el cerebro fetal (Kalish et al. 2021).

La evidencia acumulada muestra que la MIA afecta el proceso neurogénico causando una neurogénesis anticipada (McEwan et al. 2023). En cuanto a los efectos de la MIA en las células microgliales, ambos sexos mostraron un área de proceso microglial incrementada después de la exposición a Poly I:C, indicando un engrosamiento del proceso. Sin embargo, solo los machos mostraron una actividad fagocítica reducida, evidenciada por menos inclusiones celulares en los procesos microgliales. En contraste, las hembras mostraron más inclusiones celulares, indicando una actividad fagocítica más alta (Hui et al. 2018).

### ***Modificaciones epigenéticas específicas por sexo durante el desarrollo prenatal***

Los cambios epigenéticos durante el desarrollo prenatal contribuyen a las diferencias de sexo en la estructura y función cerebral. La metilación del ADN, la modificación de histonas y los ARN no codificantes son mecanismos clave a través de los cuales ocurre la regulación epigenética. El aumento en las enfermedades no transmisibles (ENT) a nivel mundial subraya la necesidad de reconsiderar los factores genéticos como los únicos contribuyentes. El concepto de "Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad" (DOHaD) sugiere que las influencias tempranas durante la gestación, la lactancia e incluso los períodos preconcepcionales juegan un papel significativo en el riesgo de enfermedades, con diferencias notables de sexo en el momento y la gravedad de los resultados de las enfermedades (Gabory et al. 2013).

Mecanismos epigenéticos específicos por sexo que regulan el desarrollo cerebral. La exposición prenatal a hormonas puede llevar a modificaciones epigenéticas específicas por sexo que influyen en la expresión génica y el desarrollo cerebral. Por ejemplo, se han observado patrones de metilación diferenciales en cerebros masculinos y femeninos, que pueden afectar las vías y resultados del neurodesarrollo (Gabory et al. 2009). Por otro lado, la acetilación de histonas, facilitada por acetiltransferasas de histonas como la proteína de unión a CREB (CBP), promueve la diferenciación de células epiteliales neurales en neuronas excitatorias e interneuronas, estimulando la transcripción de genes pro-neurales (Wang et al. 2010; Tsui et al. 2014; Yao and Jin 2014; Schoof et al. 2019).

Alteraciones cerebrales específicas por sexo en respuesta a la inflamación materna. Muchos estudios han demostrado efectos específicos por sexo de la MIA en el desarrollo cerebral y la conducta de la descendencia. Sin embargo, existe un sesgo prevalente en el análisis molecular hacia la descendencia masculina, lo que potencialmente confunde los efectos específicos por sexo (Woods et al. 2021). La expresión de genes y vías específicas relacionadas con la respuesta inmune y la regulación del estrés mostraron diferencias entre machos y hembras. Por ejemplo, los genes de señalización de corticosteroides, como *Fkbp5* (regulador de la sensibilidad del receptor de glucocorticoides), exhibieron patrones de expresión específicos por sexo, con variaciones en

respuesta a la MIA (Núñez Estevez et al. 2020). También, se han informado alteraciones en la acetilación de histonas en los cerebros de la descendencia de MIA, lo que podría explicar el fenotipo pro-neurogénico observado en estos animales (Tang et al. 2013). En ratones de tres meses de edad, se encontró que la actividad de HDAC estaba particularmente aumentada en la descendencia femenina expuesta prenatalmente al Poly I:C materno en comparación con los controles. No se pudo identificar ningún HDAC particular como principal contribuyente del efecto reportado, que estaba ausente en los machos (Pujol Lopez et al. 2016). En contraste, un estudio similar centrado en el hipocampo femenino encontró una reducción selectiva de HDAC1 asociada con un aumento en la expresión del transportador de serotonina y una anhedonia relacionada con la depresión más acentuada (Reisinger et al. 2016).

Los estresores ambientales, como la MIA, pueden llevar a una regulación epigenética alterada a través de diversas vías. Las citocinas, particularmente la interleucina-6, pueden regular las enzimas epigenéticas, aumentando la expresión de la ADN metiltransferasa 1, lo cual es de interés dado el aumento de la respuesta de citocinas en los cerebros de la descendencia tras la MIA (Braconi et al., 2010; Villagra et al., 2010; Woods et al., 2021). Además, la disponibilidad de sustratos utilizados por las enzimas epigenéticas, como la acetilcoenzima A para la acetilación de histonas, puede ser limitada. La biogénesis mitocondrial, que produce estos sustratos, a menudo es disfuncional en modelos de MIA, proporcionando una vía mecanicista para alteraciones epigenéticas y neurogénesis modificadas (Robicsek et al., 2018; Swanepoel et al., 2018; Cieślik et al., 2020, 2021; Gyllenhammer et al., 2021; Zawadzka et al., 2021).

Modificaciones placentarias específicas por sexo en respuesta a una mHFD. La placenta juega un papel crucial en el crecimiento fetal, la adquisición de nutrientes, la eliminación de desechos y la síntesis de hormonas. También, la placenta responde a factores ambientales como el estado nutricional y la oxigenación, que pueden modificar marcas epigenéticas y la expresión génica, afectando el desarrollo y la función placentaria. El desarrollo placentario es adaptable y puede compensar condiciones nutricionales pobres, con diferencias de sexo en tasas de crecimiento y respuestas a estímulos adversos. Las placentas XY son más grandes que las placentas XX, y los embriones masculinos se desarrollaban más rápido desde las primeras etapas (Gabory et al. 2013). Los estudios experimentales han demostrado que las placentas masculinas y femeninas exhiben patrones de metilación del ADN diferenciales en respuesta a dietas maternas altas en grasas, influyendo significativamente en las vías metabólicas y los procesos del neurodesarrollo. Específicamente, una HFD materna causó cambios significativos en la expresión de numerosos genes, con placentas femeninas mostrando una mayor sensibilidad a los cambios dietéticos. Además, el peso placentario generalmente fue mayor en fetos masculinos en comparación con los femeninos, independientemente de la dieta (Mao et al. 2010). Aunque no se observaron cambios obvios en la estructura del laberinto o el espongiotrofoblasto (Gabory et al. 2012). Gallou-Kabani (2010) destacó las diferencias específicas por sexo en la metilación del ADN y la expresión génica, señalando que una HFD materna administrada desde el inicio del embarazo hasta el E15, condujo a cambios significativos en las placentas en crías tanto en machos como hembras. Genes específicos como Peg10, Asb4, Peg3 y Slc22a2 mostraron una expresión más débil en la descendencia macho, mientras que Ascl2 tuvo

una expresión más débil en la descendencia hembra bajo condiciones de dieta control (Gallou-Kabani et al. 2010). Más recientemente, el mismo grupo mostró que una HFD durante la gestación causó la desregulación de genes específicos por sexo, afectando clústeres de genes y la maquinaria epigenética, incluyendo desmetilasas de histonas vinculadas al cromosoma sexual Kdm5c y Kdm5d. En condiciones de control, 104 genes exhibieron dimorfismo sexual, mientras que bajo una dieta alta en grasas, 97 genes fueron sexualmente dimórficos. Notablemente, solo 11 genes mostraron dimorfismo sexual consistente independientemente de la dieta, y apenas 16 genes fueron comúnmente afectados por la dieta en ambos sexos (Gabory et al. 2012). Todo esto muestra que no solo los conjuntos de genes, sino también sus funciones biológicas afectadas por la HFD diferían notablemente entre los dos sexos (Gabory et al. 2014).

## **Hipótesis**

Una mHFD afecta el desarrollo embrionario de la corteza cerebral de las crías generando alteraciones estructurales y funcionales

## **Objetivo general**

Analizar las consecuencias de un tratamiento agudo y crónico con una mHFD para el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria.

## **Objetivos específicos**

Objetivo específico 1:

Determinar el efecto de una mHFD sobre la neurogénesis durante el desarrollo embrionario de la corteza cerebral.

Objetivo específico 2:

Identificar los efectos de una mHFD sobre el desarrollo posnatal de la corteza cerebral.

Objetivo específico 3:

Correlacionar el estado metabólico e inflamatorio materno inducido por una HFD con las alteraciones estructurales encontradas en la corteza cerebral de las crías.

## Metodología

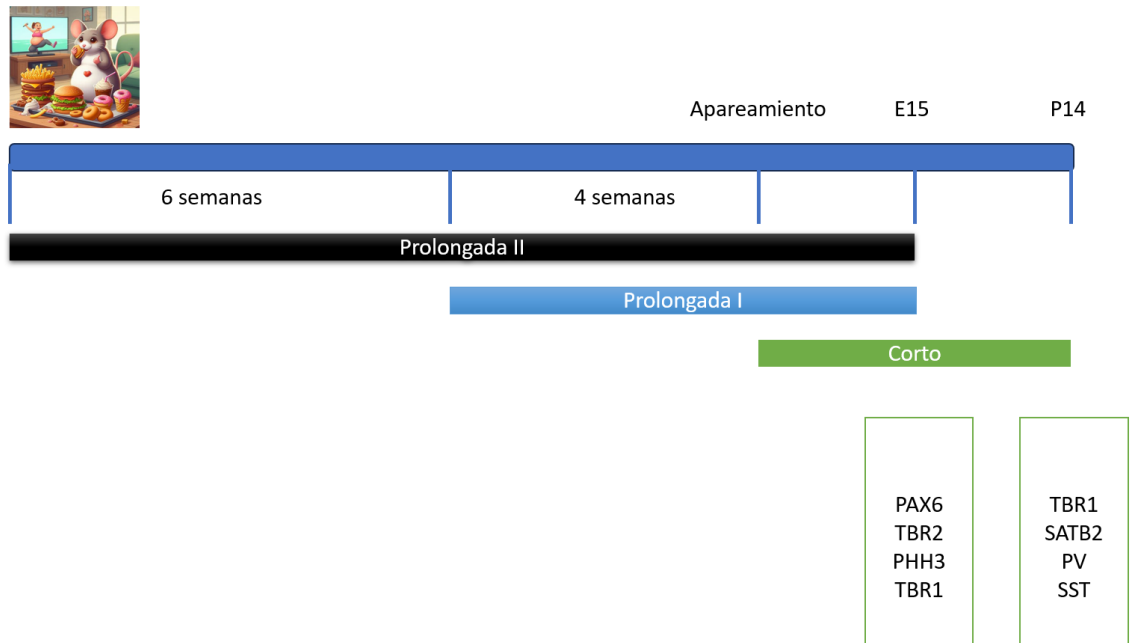
### Animales

Este estudio fue revisado y aprobado por el comité de bioética institucional en la Universidad Católica de la Santísima Concepción. Además, los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones para el trabajo con animales de experimentación europeas (FELASA) y las directrices de la Agencia Nacional de Investigación (ANID). Se utilizó un total de 6 ratones hembra, C57BL6, de 12 semanas de edad que se dividieron en 6 grupos: 3 grupos control a los que se les expuso a una dieta normal (*ad libitum*) y 3 grupos a los cuales se les trató con una HFD en 3 períodos distintos. Además de las hembras se utilizaron 3 machos para generar los apareamientos. Estos ratones macho se mantuvieron en las mismas condiciones que los ratones tratados con una dieta normal. Para el apareamiento se utilizaron tríos que se organizaron por la tarde justo antes del periodo de oscuridad. Al día siguiente, se buscó por el tapón mucoso, que es el signo del apareamiento y se determinó ese día como el día E0 (día embrionario 0). Los animales se mantuvieron en condiciones standard, con ventilación apropiada regulada en un rack ventilado, con control de la temperatura a 21 °C, ciclos de 12 h luz/oscuridad, y agua y comida *ad libitum*.

### Protocolo experimental

El tratamiento con una dieta alta en grasas (HFD) se divide en tres grupos, correspondientes a tres intervenciones dietéticas (ver Figura 2). La primera intervención consistió en una HFD durante la gestación hasta el día 15. Adicionalmente se hicieron análisis a E13 para obtener información mecanística sobre los efectos de una exposición aguda. La segunda intervención implicó una HFD durante las 4 semanas previas al apareamiento y hasta el día 15 de gestación. Por último, la tercera intervención consistió en HFD desde 10 semanas antes del apareamiento hasta 15 días después. Mientras que la intervención de corta duración (15 días) se diseñó para obtener información sobre los efectos agudos de la exposición a una HFD, las intervenciones más prolongadas se utilizaron para evaluar los efectos tanto de la HFD como de la obesidad y sus consecuencias. Esto es relevante debido a la variabilidad en la exposición a una HFD en mujeres embarazadas, algunas de las cuales tienen una exposición crónica, mientras que otras modifican sus hábitos alimenticios (Crozier SR et al., 2009). El porcentaje de kilocalorías proveniente de las grasas que se utilizó en la dieta fue del 45 %, debido a que esta dieta para roedores se usó para modelar la obesidad humana. A pesar de que con 32% (Tozuka et al., 2010) de grasa en la dieta se pudo encontrar anomalías celulares, y que la mayoría de los estudios utilizan una dieta con un 60% de la energía proveniente de las grasas, se proyectó que con la dieta del 45% en distintos tiempos de duración de la intervención esta permitiría evidenciar las alteraciones celulares en la neurogénesis en la corteza cerebral. A los grupos control se le suministró una dieta normal (NFD) con un 10 % kcal provenientes de las grasas que se obtuvo de la empresa Research Diets con código de ítem D12450H, la HFD

que se utilizó con los grupos experimentales se obtuvo de la misma empresa con código de ítem D12451 (Tablas I y II).



**Figura 2. Diseño experimental implementado.** Se implementaron 3 modelos de HFD, uno corto que comenzó el día del apareamiento y concluyó en el E15. También se realizaron análisis puntuales a E13 para la intervención aguda (no incluido en el esquema). Uno prolongado que comenzó 1 mes antes del apareamiento y otro más prolongado que comenzó 10 semanas antes del apareamiento. Se realizó inmunohistoquímica en el E15 para todos los modelos y en el caso del modelo corto se realizó también en el P14. Notar que para el análisis a P14 la dieta se cambió desde la HFD a la dieta control el día E15. Marcadores: PAX6, progenitores apicales; TBR2, progenitores intermediarios; PHH3, histona H3 fosforilada (células proliferativas); TBR1, neuronas profundas; SATB2, neuronas superficiales; PV, interneuronas que expresan Parvalbúmina; SST, interneuronas que expresan somatostatina.

**Tabla I.** Ingredientes de la dieta de los ratones según indica la compañía ResearchDiet.

Clase	Ingrediente	NFD (12450H)	HFD (12451)
Proteína	Caseína Láctica malla 30	200.00 g	200.00 g
Proteína	L-Cisteína	3.00 g	3.00 g
Carbohidrato	Almodón de maíz	452.20 g	72.80 g
Carbohidrato	Sucrosa	176.80 g	176.80 g
Carbohidrato	Maltodextrin 10	75.00 g	100.00 g
Fibra	Celulosa, BW200	50.00 g	50.00 g
Grasa	Aceite de Soya	25.00 g	25.00 g
Grasa	Manteca de cerdo	20.00 g	177.50 g
Mineral	Mezcla mineral, formulación S10026B	50.00 g	50.00 g
Vitamina	Bitartrato de colina	2.00 g	2.00 g
Vitamina	V10001C	1.00 g	1.00 g
Tinte	Dye, Yellow FD&C #5, Alum. Lake 35-42%	0.04 g	
Tinte	Dye, Red FD&C #40, Alum. Lake 35-42%	0.01 g	0.05 g
Total		1055.05 g	858.15 g

**Tabla II.** Desglose de la composición de la dieta según macromoléculas principales.

Clase	NFD (D12450H)		HFD (D12451)	
	gm %	Kcal %	gm %	Kcal %
Proteínas (g)	19.2	20	24	20
Grasa total (g)	4.3	10	24	45
Carbohidratos (g)	67.3	70	41	35
Kcal/gm	3.85		4.73	

Para los análisis, se utilizaron muestras de cerebros embrionarios al día E15. Se utilizaron tres embriones machos y tres hembras de la camada por cada situación experimental. A diferencia de lo que generalmente se encuentra en la literatura (donde se utilizan principalmente machos), en este caso se incluyeron ambos sexos. Esta decisión está justificada por el hecho de que, aunque se han observado efectos diferenciales entre ambos sexos, el sexo femenino también se ve afectado por trastornos del neurodesarrollo. En el E15 se genotiparon los embriones para determinar el sexo y se procesaron para realizar el análisis inmunohistoquímico. La evaluación del proceso neurogénico en el cerebro en desarrollo se facilitó mediante múltiples marcadores detectados con anticuerpos específicos (Tabla III). Se marcaron y cuantificaron las células progenitoras utilizando los anticuerpos PAX6 y TBR2. Para medir la división celular, se emplearon anticuerpos contra PHH3. Además, se utilizaron combinaciones de tinciones para revelar diferentes dinámicas durante el desarrollo. La combinación PAX6/TBR2/PHH3 permitió evaluar la neurogénesis temprana, mientras que la combinación de TBR2 y TBR1 se utilizó para evaluar la neurogénesis en las primeras etapas del desarrollo embrionario, enfocándose en la diferenciación de progenitores TBR2 positivos a neuronas TBR1 positivas en las capas más profundas de la corteza cerebral. En estudios posnatales se emplearon los marcadores SATB2 y TBR1 para marcar las neuronas excitatorias en el día P14, y SST y PV para marcar las interneuronas en el mismo día. Además, se analizó el perfil metabólico e inflamatorio de la madre mediante suero materno, y se estudió el perfil inflamatorio de la placenta utilizando citometría de flujo.

**Tabla III.** Marcadores utilizados en inmunohistoquímica

Marcador	Célula
PAX6	Progenitores Apicales
TBR2	Progenitores Intermediarios
PAX6/TBR2	Diferenciación de progenitores apicales a intermediarios
TBR1	Neuronas generadas tempranamente
TBR1/TBR2	Diferenciación de progenitores intermediarios en neuronas
SATB2	Neuronas excitatorias de capas superiores
PHH3	Células en mitosis
PV	Interneuronas que expresan parvalbúmina
SST	Interneuronas que expresan somatostatina

### **Extracción, fijación del cerebro y crio secciones**

En el día embrionario 15 (E15), extrajeron los embriones. Luego de la extracción de los embriones se extrajo el cerebro para fijarlos por inmersión en formaldehído al 4%, preparado a partir de stock 10X (Sigma, Cat.: F8775) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Los cerebros fueron crio protegidos durante la noche o el fin de semana en sacarosa (Sigma, Cat.: 84097) al 30% disuelta en una solución tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente el tejido fue embebido en OCT (Fisher HealthCare, Tissue Plus Cat.: FIS23-730-571) y congelado en hielo seco para luego ser almacenado a -80 grados. El tejido luego fue procesado para obtener crio secciones de 20 µm utilizando el criostato Leica CM100 a -13 °C. Se rotularon 6 cristales cargados positivamente (PorLab Scientific, Cat.: PC2-302-8) y cada corte fue depositado en ellos de modo alterno de tal manera que cada cristal contenía cortes de toda la corteza cerebral.

### **Genotipado de sexo**

Al finalizar cada experimento se extrajo material embrionario o postnatal de la cola o extremidades para conocer el sexo de las crías. Las muestras se prepararon para genotipado extrayendo con un kit (KAPA mouse geotyping kit Cat.: KK7352). Para esto se añadió 100 microlitros de la siguiente mezcla para genotipar a las muestras: agua de biología molecular (88µl), Kapa Express extract buffer 10x (10 µl) y Enzyme (2 µl). Añadida la solución a cada muestra, se colocan en agitador por 10 minutos a 70 °C y 400 rpm. Luego de esto se añadió 45 µl de TrisHCl (Calbiochem, Cat.: 648317) 10 mM a cada tubo. Se colocó en agitador a 95 °C por 5 minutos a 400 rpm. Se deja enfriar y se centrifuga por 3 minutos a 4000 rpm. En el caso de las muestras postnatales, se diluyó el sobrenadante 10 veces con TrisHCL 10mM pH 8 - 8.5.

Una vez digerido el tejido, se realizó PCR para genotipar utilizando el kit GoTaqG2. Se rotularon los tubos a los cuales se les añadió los siguientes componentes: GoTaqMaster mix (12 µl), SN (0.5 µl), AS (0.5 µl), agua de biología molecular (10,5 µl) y ADN (1 µl) obtenido del paso anterior. Luego de esto se colocó en el termociclador usando el siguiente protocolo de 3 etapas. La primera etapa se calentó la muestra a 94 °C por 2 minutos. En la segunda etapa consistió en 10 ciclos, primera 65 °C por 20 segundos y luego 68 °C por 30 segundos. Por último, la etapa 3 fueron 28 ciclos: 94 °C por 20 segundos y 60 °C por 20 segundos. Luego de finalizado el programa anterior, se preparó gel de agarosa (1.5 g de agarosa para 100 ml de TAE 1x y 2 µl de máster SAFE). Se colocaron 25 µl de la muestra amplificada en los pocillos del gel y se realizó la electroforesis a voltaje constante de 100V por 20 minutos. Una vez corrido en gel, se colocó gel en el foto-documentador. Si se observó una banda correspondió a macho y 2 bandas a hembra.

### **Inmunohistoquímica**

Para conocer los efectos de una dieta alta en grasa sobre los procesos de proliferación y diferenciación que ocurren en la corteza embrionaria se realizó una tinción de inmunohistoquímica sobre los cortes coronales de cerebro embrionario (E15) previamente realizados. En esta etapa los anticuerpos utilizados fueron PHH3, PAX6, TBR2, TBR1. Para cada procedimiento no se utilizaron todos los anticuerpos debido a incompatibilidad

de origen. Por tanto, para lograr obtener las imágenes de inmunohistoquímica pertinente se lograron en dos tinciones donde el protocolo fue el mismo pero la combinación de anticuerpos, el momento y los cristales a utilizar fueron distintos. Así primero se obtuvo una tinción con PHH3, PAX6 Y TBR2. Posteriormente en otra tinción diferente se procedió con TBR1/TBR2 con distintos cristales. El protocolo se describe a continuación. Primero se seleccionaron los cristales con los cortes donde se marcaron los bordes con plumón hidrofóbico para evitar que la solución bloqueadora sobrepase los bordes del cristal. Se procedió a los lavados con PBS de los cristales con las muestras. El PBS es una solución isotónica, lo que significa que tiene una concentración de sales similar a la de las células, contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Al lavar con PBS, se mantienen las condiciones adecuadas para las células y los anticuerpos, evitando cambios osmóticos que podrían dañar la muestra. Además, el PBS elimina cualquier sustancia no deseada que pueda estar presente en la muestra, como residuos de OCT. Esto reduce el ruido de fondo y mejora la especificidad del ensayo. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación a 80 revoluciones por minuto para luego dejar los cristales en una solución de citrato (Sigma Aldrich, Cat.: c8532) a 100 °C por 5 minutos. El citrato se utiliza en la técnica de inmunohistoquímica para recuperar los epítomos que se han desnaturalizado durante la fijación. Una vez hervido, se procedió al lavado con PBS por 5 minutos y luego de esto se incubaron los cristales con solución de bloqueo (3% Normal Goat Serum + 0.1% tritón) por 1 hora a temperatura ambiente en cámaras de incubación. EL NGS (Normal Goat Serum, Thermo Fisher Scientific) de la solución de bloqueo se utiliza para prevenir la unión no específica de los anticuerpos a utilizar, mientras que el tritón-100 (Winkler), que es un detergente, es añadido para garantizar la permeabilización de las membranas celulares y que los anticuerpos puedan reconocer los epítomos de factores de transcripción al interior del núcleo. Pasado este tiempo, se eliminó la solución bloqueadora de los cristales y se añadió el mix de anticuerpos y se dejó incubando durante toda la noche a 4 °C en las cámaras de incubación diseñadas a tal efecto. Para lograr el mix de anticuerpos, estos se diluyeron en solución bloqueadora con la siguiente concentración: PHH3 (3377S, Cell Signaling, USA. 1:1000) hecho en conejo, PAX6 (562388, BD Biosciences 1:200) hecho en ratón, TBR2 (566749, BD Bioscience, 1:300) hecho en rata y TBR1 (AB31940, Abcam, 1:100) hecho en conejo.

El anticuerpo primario, específico para el antígeno de interés, se incuba con la muestra a 4 °C durante toda la noche. La baja temperatura ayuda a reducir la velocidad de las reacciones y permite una unión óptima y específica entre el anticuerpo y el antígeno. Esto mejora la precisión y la fiabilidad de los resultados del ensayo. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se lava la placa minuciosamente para eliminar las moléculas no unidas. Este paso ayuda a eliminar cualquier unión no específica que pueda interferir con la precisión del ensayo. En este caso se procedió a lavar los cristales en PBS 3 veces por 5 minutos en agitación (80 rpm). Luego de esto se añadió el mix de segundos anticuerpos A647 anti-conejo, A555 anti-rata, A488 anti-ratón (Jackson immunoResearch). Todos con una concentración de 1:200 se diluyeron en solución bloqueadora. Añadidos los segundos anticuerpos se procedió a incubar con estos durante una hora a temperatura ambiente en cámaras de incubación. Pasada la hora de incubación, se eliminaron los anticuerpos y se añadió DAPI 1x diluido en PBS aplicando 200 microlitros a cada cristal y se dejó incubando por 5 minutos. Pasado este tiempo se lavaron los cristales con las muestras en PBS tres veces por 5 minutos a 80 rpm. Posteriormente los cristales

fueron montados con solución para montaje cubiertos con cubreobjetos y dejados en una carpeta para poder ser visualizados en el microscopio.

Para la inmunohistoquímica realizada en el día P14, se analizaron las neuronas excitatorias positivas a SATB2 y TBR1. El protocolo de tinción fue el mismo descrito anteriormente y las concentraciones utilizadas fueron para el SATB2 1:500 (AB51502, Abcam, ratón), y para el TBR1 se utilizó 1:400. TBR1 es un factor de transcripción que se expresa en las neuronas de proyección posmitóticas que se generan en la etapa embrionaria temprana (Englund et al., 2005) y en el cerebro posnatal. Así las neuronas que se encuentran en la capa VI expresan TBR1 (Crespo et al., 2022). En cuanto a SATB2, al P14 lo podemos encontrar presente en las neuronas corticales distribuido homogéneamente en la corteza cerebral y se ha descrito ser necesario para la arborización dendrítica y el espaciamiento de los somas (L. Zhang et al., 2012).

Para la tinción de los dos grupos principales de interneuronas, se utilizaron los anticuerpos anti-PV (NB120-11427, Novus Biological. 1:300), con exposición al citrato de 1 minuto y anti-SST (sc55565, Santa Cruz, 1:400), con una exposición al citrato de 5 minutos. El resto del procedimiento se mantuvo con las mismas condiciones antes mencionadas. Los anticuerpos secundarios utilizados en esta ocasión fueron secundario hecho en burro anti-conejo FITC y secundario hecho en burro anti-ratón TRITC (Jackson immunoResearch) con una dilución 1:200.

### **Toma de imágenes y Procesamiento de Imágenes**

Para la toma de imágenes se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 700 con un objetivo de 20x y se tomaron imágenes de la corteza cerebral en aquellos cortes coronales donde se encontraba la eminencia gangliónica medial. Se tomó una imagen por hemisferio cerebral que abarcara toda la corteza. Como resultado por cada cristal, que equivale a un animal, se tomaron en aquellos casos donde fue posible, debido a la integridad de los cortes, 6 imágenes. Para el procesamiento de las imágenes y conteo celular se utilizó ImageJ y CellProfiler. Con el primero y auxiliado por un script de Python para la automatización del proceso se seleccionó el plano de la imagen donde mejor se observaban las células a contar teniendo en cuenta la intensidad del plano y buscando el plano con mayor número de células. Por lo general, este plano corresponde al plano central debido que durante la toma de imágenes en el microscopio se localizó el centro del corte y se informó al software de microscopía la localización de tal manera que el plano central de la imagen final correspondiera al centro del tejido en cuestión. Una vez localizado el plano de interés donde se realizaría el conteo se exportó este plano para cada uno de los canales de la imagen. El pipeline con los parámetros utilizado en CellProfiler para el conteo automático se ajustó a la procedencia de cada set de imágenes. Esto es, las imágenes tomadas el mismo día procedente de la misma inmunohistoquímica se utilizaron los mismos valores para el conteo celular de ambas condiciones (NFD vs HFD) garantizando así la comparación entre ambos grupos, pero si fueron de inmunohistoquímica de distintos días los valores de los parámetros que determinaban el umbral que determinaba la intensidad por sobre la cual se apreciaban las células, variaron debido a que el ruido fue diferente en cada set de imágenes. Sin embargo, para mantener la homogeneidad del procesamiento y un correcto análisis

estadístico y puesto que la pregunta de investigación requería analizar el grupo control (NFD) vs grupo experimental (HFD) los parámetros no se cambiaron de un grupo a otro, garantizando la integridad de la comparación.

### **Cálculo del ángulo de división de los AP**

Se reconocieron y analizaron las figuras mitóticas en la superficie apical de la zona ventricular. Para esto se utilizó PHH3, el cual es un marcador de la transición de G2 a M y por tanto que marca aquellas células que se encuentran en división. La orientación del plano de clivaje se determinó midiendo el ángulo del plano de clivaje con respecto a la superficie ventricular. Solo se contaron las células en fase metafásica y anafásica. Las células mitóticas se dividieron en tres tipos según el ángulo del plano de clivaje: horizontal (0-30°), oblicuo (30-60°) y vertical (60-90°). Cada tipo de orientación se agrupó por separado y se calculó como la proporción del total de células mitóticas contadas.

### **Determinaciones de metabolitos por métodos espectrofotométricos**

La determinación de colesterol total en suero se realizó mediante el método enzimático de punto final CHOD-PAD, el cual se basa en el acoplamiento de las reacciones del colesterol oxidasa y peroxidasa, a través de peróxido de hidrógeno como intermediario común. Para la reacción se utilizó el kit comercial Colesterol Liquiform (Labtest), se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y mezclaron 5 uL de cada muestra de suero con 500 uL de reactivo enzimático y se incubaron a 37°C por 5 minutos. Como controles, se realizó la reacción para estándar de colesterol de 200 mg/dL y agua destilada (blanco reactivo). La medición de absorbancia se realizó en fotómetro (Photometer 5010 v5+m Robert Riele) a una longitud de onda de 492 nm, midiendo consecutivamente el blanco, estándar y posteriormente las muestras.

### **Triglicéridos en suero**

La determinación de triglicéridos en suero se realizó mediante método enzimático de punto final, basado en la una secuencia de reacciones de lipoproteína lipasa, glicerolquinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y peroxidasa; produciendo el quinoneimina como producto final coloreado a partir de triglicéridos. Para la reacción se utilizó el kit comercial Triglicéridos Liquiform (Labtest). Para ello se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, y mezclaron 5 uL de cada muestra de suero con 500 uL de reactivo enzimático y se incubaron a 37°C por 5 minutos. Como controles, se realizó la reacción para estándar de triglicéridos de 200 mg/dL y agua destilada (blanco reactivo). La medición de absorbancia en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele) se realizó a longitud de onda de 492 nm, midiendo el blanco, estándar y muestras, consecutivamente.

### **Colesterol LDL en suero**

La determinación de colesterol LDL en suero se realizó mediante una modificación del método enzimático de punto final CHOD-PAD, el cual permite excluir a quilomicrones, cVLDL y cLDL previo al paso de oxidación de colesterol. Se cuantificaron los niveles de colesterol LDL mediante el kit comercial LDL Cholesterol liquicolor (Human Diagnostics). Para este fin, se descongelaron las muestras de suero a temperatura ambiente,

y se mezclaron con 5 uL de estándar calibrador (239 mg/dL en cLDL) y 750 uL de reactivo enzimático (R1), incubando a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregó 250 uL de sustrato (R2), incubando a 37° por 5 minutos para finalmente medir absorbancia a 555 nm en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele).

### **Niveles de glucosa en suero**

La determinación de los niveles de glucosa en suero de los animales se realizó mediante método enzimático de punto final GOD-PAP, el cual se basa en el acoplamiento de las reacciones de la glucosa oxidasa y peroxidasa, a través de peróxido de hidrógeno como intermediario común. Para realizar el ensayo colorimétrico se usó el kit comercial Glucose Liquicolor (Human Diagnostics), mezclando 5 uL de muestra con 1 mL de reactivo e incubando por 5 minutos. Reacciones análogas se realizaron con agua para blanco reactivo y con estándar de glucosa. La medición de absorbancia a 492 nm se realizó en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele).

### **Niveles de citocinas en la placenta**

La placenta de las crías se recolectó a E15 y almacenó a -80 °C para la preservación del tejido a espera de ser procesado. La placenta se homogeneizó en un tampón RIPA (un tipo de solución utilizada para romper las células y liberar las proteínas) con un cóctel de inhibidores de proteínas (para prevenir la degradación de las proteínas). Brevemente, las muestras se disociaron mecánicamente para romperlas en partes más pequeñas, y se sonicaron en hielo. La sonicación es un proceso que utiliza ondas de sonido para romper las células. Los lisados celulares se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C. La centrifugación separa los componentes de la solución por su tamaño y densidad. Posteriormente el sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta la medición.

En el procedimiento descrito se cuantifican los niveles de citoquinas de IFN-g, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, e IL-13, que son citocinas importantes en la señalización celular de la respuesta inflamatoria. Este análisis se realizó mediante citometría de flujo utilizando el panel LEGENDplex™ MU Th1/Th2 (8-plex)w/VbP V03 (Biolegend). Para preparar las muestras se realizaron diluciones seriadas del estándar y luego se incubaron con beads a temperatura ambiente durante 2 horas. Los beads están recubiertas con anticuerpos que se unen a las proteínas de interés, en este caso las citocinas. Posteriormente, las muestras se lavaron e incubaron con anticuerpos de detección durante 1 hora a temperatura ambiente. Estos anticuerpos se unen a un sitio diferente en las proteínas de interés. Después de la incubación y el lavado, las muestras se leyeron en un citómetro de flujo FACS Canto II. Este instrumento utiliza la luz para detectar y cuantificar las proteínas en las muestras. El análisis de los datos se realizó con el software LEGENDplex™. Los resultados se presentaron en gráficos para machos y hembras por separado, expresados en ng/mL. Este procedimiento permitió la detección y cuantificación de múltiples citocinas simultáneamente, lo que proporcionó una visión valiosa de la respuesta inmunológica.

### **Insulina**

La insulina se determinó usando el kit rat/mouse Insulin Enzyme Linked-immunoassay sándwich EDM Milipore. La cantidad de proteína se detecta por reacción del conjugado enzimático con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, registrando absorbancia a 450 nm. Los resultados se expresan en ng/ml y se obtienen interpolando la absorbancia desde la curva estándar.

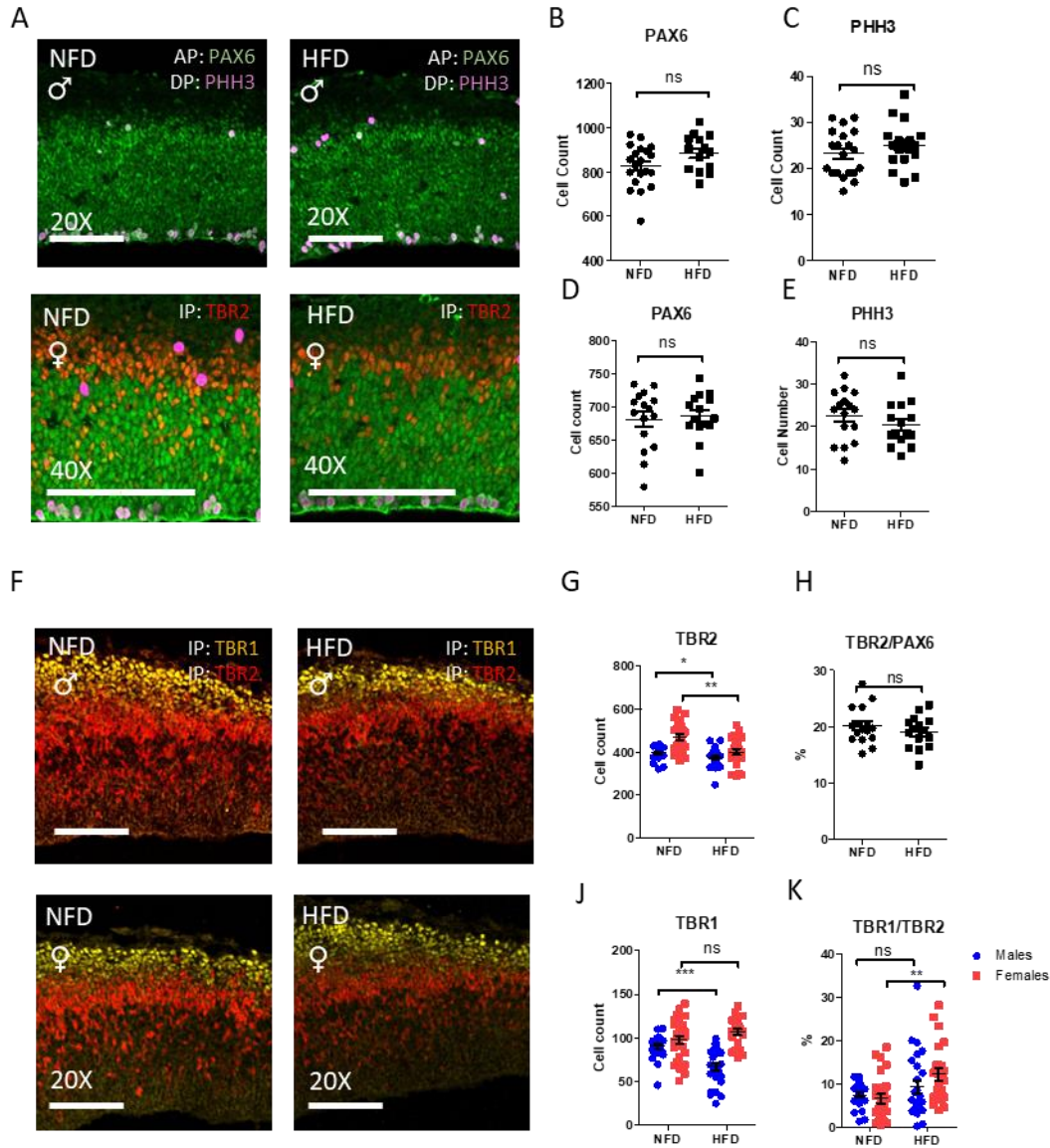
### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico y la generación de los gráficos se realizó en el software Prisma. Para la comparación entre los grupos (NFD vs HFD) se utilizó la prueba estadística t-test con corrección de Welch. El tamaño de muestra utilizado consideró el número de imagen total por cada situación experimental y no el número de cerebros utilizados para cada grupo experimental. Esto por cada situación experimental hubo al menos 3 cerebros, de cada cual se contabilizó el número celular en cada uno de los slice de la zona de interés, tomando 6 microfotografías por cada cerebro. Como resultado el número de muestra fue al menos de 18 (6 microfotografías por 3 cerebros embrionarios) para cada condición (NFD vs HFD). Sin embargo, el número de muestra varió puesto que en algunos experimentos no se pudo tomar 6 microfotografías por cerebro. Para comparar el efecto de la mHFD de acuerdo con el sexo, se empleó la h de hedge.

## Resultados

### La dieta alta en grasa materna altera la dinámica de la corteza en desarrollo

El efecto de una mHFD fue investigado usando un tiempo corto de exposición a la HFD que comenzó desde el día de la concepción (E0) y culminó en el día embrionario 13 (E13) o 15 (E15). En el día embrionario E13 y E15 los cerebros fueron disectados, procesados y analizados por inmunohistoquímica. Para evaluar la dinámica de los progenitores que dan origen a las células de la corteza cerebral se comenzó analizando los progenitores intermediarios. Los progenitores intermediarios fueron marcados con TBR2 (figura 3 A y F) y se observaron disminuidos en ambos sexos al E13 en la descendencia expuesta a una mHFD (Figura 3 G). En adición a esto, el tamaño de efecto medido por la *h* de Hedge indicó diferencias entre ambos sexos en cuanto al efecto observado, siendo el efecto grande en las hembras y mediano en los machos (Tabla IV). Para entender el origen de la diferencia en los IPs, se analizaron los AP (Figura 3 B y D). Con respecto a los AP, las células que expresan el factor de transcripción PAX6, aumentaron en número en la condición experimental, tanto en machos (Figura 3B) como en hembras (Figura 3D), pero este aumento no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, al analizar el tamaño del efecto (tabla IV), se vio que había un efecto medio, es decir, visible al observar los datos, en los machos, mientras que en las hembras el efecto fue pequeño. También se analizaron los dobles positivos TBR2/PAX6+ (Figura 3H), lo que no arrojó diferencias significativas en hembras. No se pudo realizar en machos debido a que no fue posible realizar la inmunohistoquímica PAX6 y TBR2 en simultáneo usando los mismos cristales por falta de cristales con muestras de tejidos. Teniendo en cuenta que, los IP derivan de divisiones asimétricas de los AP, se cuantificaron las células marcadas con PHH3. Dicha cuantificación (Figura 3 C y E) no arrojó diferencias significativas en ambos sexos. En referencia a las neuronas recién generadas (NN), que se marcan con TBR1 (Figura 3J), se encontró que dicha población celular disminuyó en los machos, pero no en las hembras. Analizando los dobles positivos TBR1/TBR2 (Figura 3K) no hubo diferencias en los machos; sin embargo, en las hembras, este doble marcaje se encontró significativamente aumentado. Estos resultados sugieren que el efecto difiere de acuerdo con el sexo. En los machos, la evidencia sugiere que la transición de AP a IP está afectada, lo que se manifiesta en una reducción en los IP y NN. Por su parte, en las hembras la evidencia sugiere que la diferenciación de los IP a NN es la afectada, lo que se manifiesta con un aumento de células en el proceso de diferenciación (TBR1/TBR2). En cualquier caso, el efecto sobre los IP es mayor en las hembras que en los machos (Tabla IV). Los resultados muestran que la mHFD altera el desarrollo de la corteza cerebral afectando la dinámica celular de los progenitores, así como la diferenciación desde el E13 tanto en machos como en hembras, siendo estos efectos diferentes en ambos sexos (Figura 3).



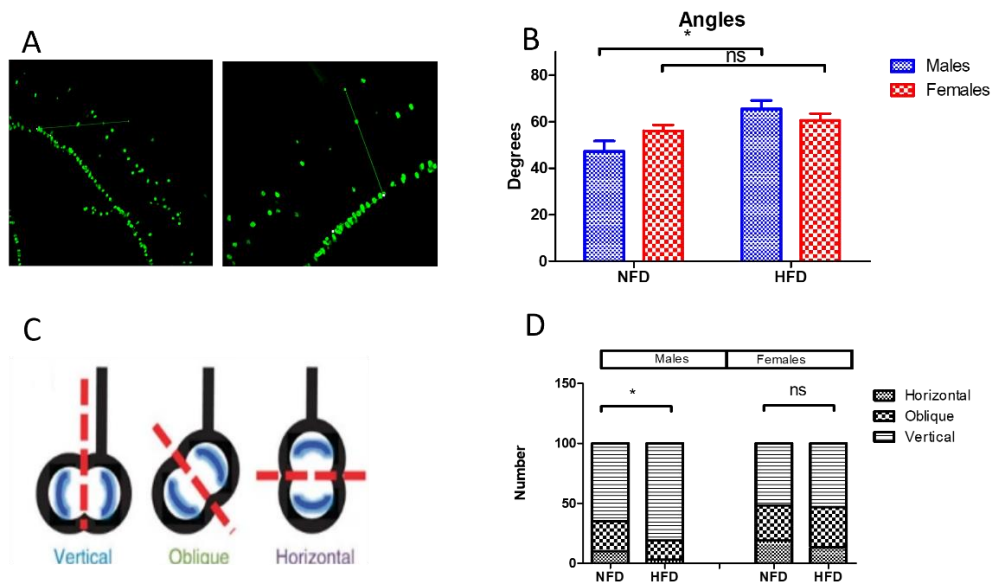
**Figura 3. La dieta alta en grasa materna altera la dinámica celular de los progenitores y la neurogénesis al E13.** A-F Inmunohistoquímica de secciones coronales en el E13. Las filas superior e inferior muestran a los machos y hembras respectivamente A) Los progenitores apicales (AP) se marcaron con PAX6, los progenitores intermedarios (IP) con TBR2 y los progenitores que se estaban dividiendo se marcaron con PHH3 tanto para la dieta control (NFD) como para la dieta alta en grasa (HFD) F) Se tiñó a los IP con TBR2 y a las neuronas recién generadas (NN) con TBR1. B y C) Cuantificación de PAX6 y PHH3 para machos. D y E) cuantificación de PAX6 y PHH3 para hembras G) cuantificación de las células positivas para TBR2 H) cuantificación para las células TBR2+/Pax6+ de los embriones hembras. J) cuantificación de células TBR1+ K) cuantificación de células doble positivas para TBR1 y TBR2 expresadas como porcentajes del TBR2. N es el número de cortes utilizados para cada análisis ( $N \geq 15$ ) para cada condición. \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$ .

**Tabla IV.** La mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E13.

Marcadores	Machos		p	TE	Hembras		p	TE
	NFD	HFD			NFD	HFD		
PAX6	827.2 ± 21.57	886.2 ± 21.90	0,06	<b>-0,66</b>	681.1 ± 11.23	686.1 ± 8.99	0,73	-0,12
TBR2	396.4 ± 6.48	373.8 ± 8.69	0,04	<b>0,59</b>	468.2 ± 13.02	400.1 ± 14.00	0,0009	<b>1,09</b>
PHH3	23.15 ± 1.10	24.94 ± 1.12	0,26	-0,36	22.63 ± 1.44	20.33 ± 1.31	0,24	0,42
TBR1	90.35 ± 2.82	67.04 ± 4.11	< 0.0001	<b>1,31</b>	97.85 ± 4.72	106.5 ± 3.45	0,14	-0,42

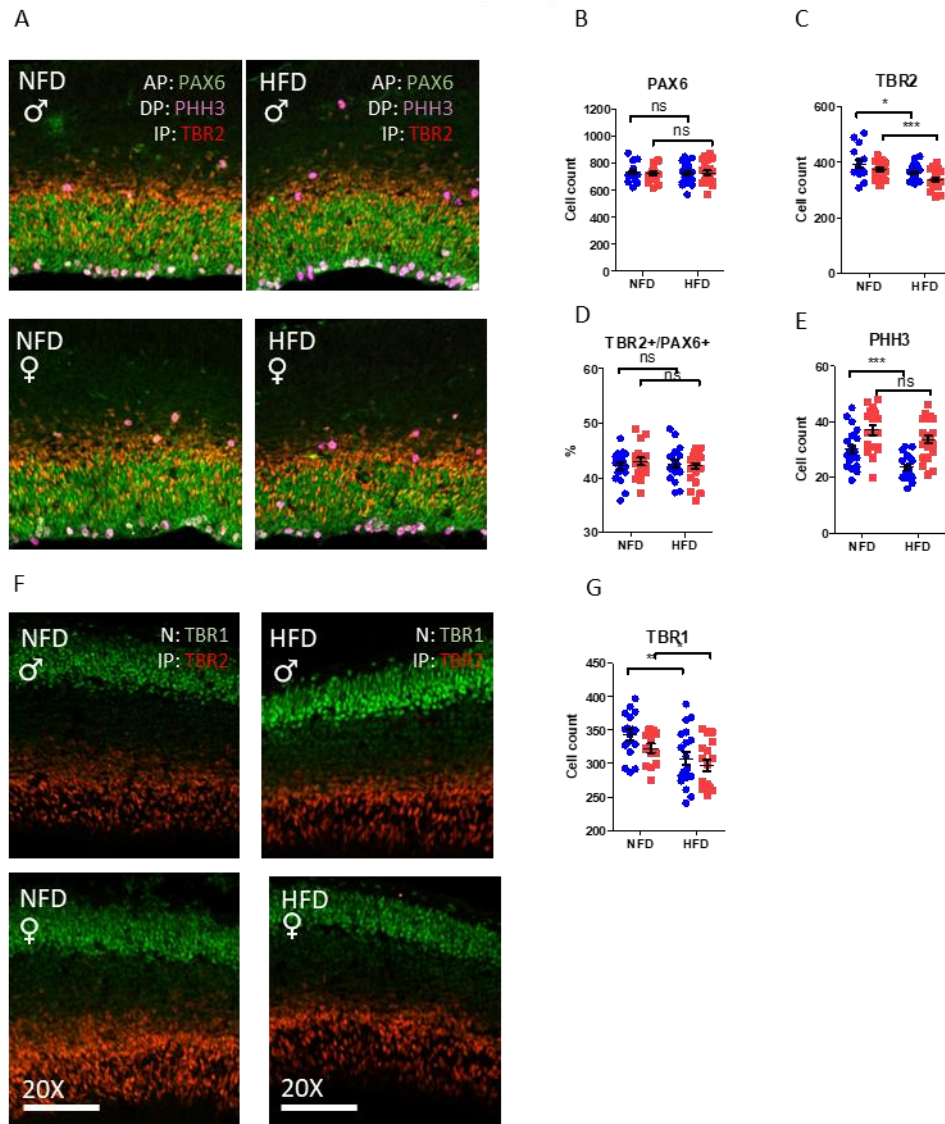
Células positivas para marcadores inmunohistoquímico expresados en media ± error estándar para cada una de las condiciones analizadas y según sexo. P: p value. TE: tamaño del efecto. Los marcadores utilizados corresponden a PAX6: progenitores apicales, TBR2: progenitores intermediarios, PHH3: marcador de proliferación celular, TBR1: neuronas recién generadas.

Siguiendo con lo anteriormente expuesto, se analizó el ángulo de división de las células apicales que se encontraban dividiendo. Según se ha publicado, resulta ser que el ángulo de división se correlaciona con el destino de las células hijas. Mientras más cercano a  $90^\circ$  sea el ángulo, aumenta la probabilidad de que dicha división sea simétrica, dando lugar a dos células hijas iguales. Mientras más cercano a la horizontal sea el ángulo de división, tendremos que la división ocurrirá de forma asimétrica, dando lugar a un IP y a un AP o NN. El análisis del ángulo de división se muestra en la Figura 4. Para calcular el ángulo de división se localizaron las imágenes mitóticas y se trazó una línea perpendicular al huso mitótico. Luego, se calculó el ángulo formado por esta línea y una línea tangente al borde apical de la corteza cerebral (Figura 4A y C). Como se puede apreciar en el panel B de la figura 4, hubo un incremento significativo en el valor del ángulo de división acercándose este más a  $90^\circ$  en los machos HFD en comparación con el control. En las hembras, el ángulo no aumentó significativamente en respuesta a una HFD. Al clasificar los ángulos (Figura C-D) encontrados en 3 categorías: recto (entre  $60^\circ$  y  $90^\circ$ ), oblicuo (entre  $30^\circ$  y  $60^\circ$ ) u horizontal (menor a  $30^\circ$ ), se observó que una dieta mHFD modificó el ángulo de división en la descendencia masculina, pero no en las hembras expuesta a mHFD. Este resultado se alinea con el anterior donde se observó un aumento en los AP selectivamente en machos, lo que determinaría una disminución de los IP y subsecuentemente de las NN. Por su parte en las hembras domina el efecto de una diferenciación aumentada de los IP a NN.



**Figura 4. La mHFD modifica el ángulo de división en los machos aumentando la tasa de divisiones simétricas de los AP.** A) Imagen ilustrativa de las líneas utilizadas para cuantificar el ángulo de división de las figuras mitóticas B) cuantificación del ángulo de división en ambos sexos expresados en grados sexagesimales C) Categorías utilizadas para clasificar los ángulos calculados, donde el ángulo vertical es el más cercano a 90 grados. D) chi-test para variables categóricas. \*:  $p < 0.05$

Después de analizar E13, se analizó la dinámica de los progenitores en el E15, luego de 15 días de una mHFD (Figura 5 A y F). Los IP continuaron disminuidos al E15 (Figura 5C) siendo las hembras ( $373.5 \pm 6.388$  N=19 vs  $337.7 \pm 6.555$  N=23) las más afectadas con un tamaño de efecto de 1.20 vs 0.74 contra los machos,  $395.0 \pm 14.03$  N=16 vs  $373.5 \pm 6.388$  N=19 (Tabla V). Sin embargo, los AP no se encontraron afectados (figura 5B) ni en machos ( $730.4 \pm 15.01$  N=18 vs  $722.5 \pm 13.96$  N=24) ni en hembras ( $723.0 \pm 11.62$  N=19 vs  $728.3 \pm 16.08$  N=23), a pesar de que las células marcadas con PHH3 estuvieron disminuidas en los embriones machos ( $30.13 \pm 1.289$  N=24 vs  $23.67 \pm 1.060$  N=18,  $p = 0.0004$ ) de aquellas ratonas expuestas a una HFD (Figura 5E). Los doble positivos TBR2/PAX6 (Figura 5D), que hablan sobre la transición de los AP a IP no se encontró alterado en ningún sexo (machos:  $42.16 \pm 0.6583$  N=18 vs  $42.58 \pm 0.7396$  N=18  $p = 0.68$ ; hembras:  $42.97 \pm 0.6671$  N=19 vs  $42.14 \pm 0.5554$  N=23,  $p = 0.34$ ). En el caso de las NN (Figura 5G), en ambos sexos se encontraron disminuidos en la descendencia de madres expuestas a HFD (machos:  $342.8 \pm 7.980$  N=17 vs  $307.6 \pm 9.775$  N=19; hembras:  $322.8 \pm 7.090$  N=13 vs  $296.7 \pm 8.467$  N=17), además el efecto (tabla V) fue mayor en los machos ( $h = 0,92$ ) que en las hembras ( $h=0,85$ ). En esta etapa (E15) del desarrollo de la corteza cerebral no se puede analizar la transición de TBR2 a TB1, usando dobles positivos TBR2/TBR1, ya que estas poblaciones celulares están muy separadas entre sí (Figura 5 F). Con esto observamos que el efecto sobre machos y hembras es diferencial. Mientras los machos son afectados en mayor manera en los APs de manera más temprana, las hembras se ven afectadas en los IPs de forma tardía entre los días E13 y E15, impactando en ambos casos en las NN a E15.



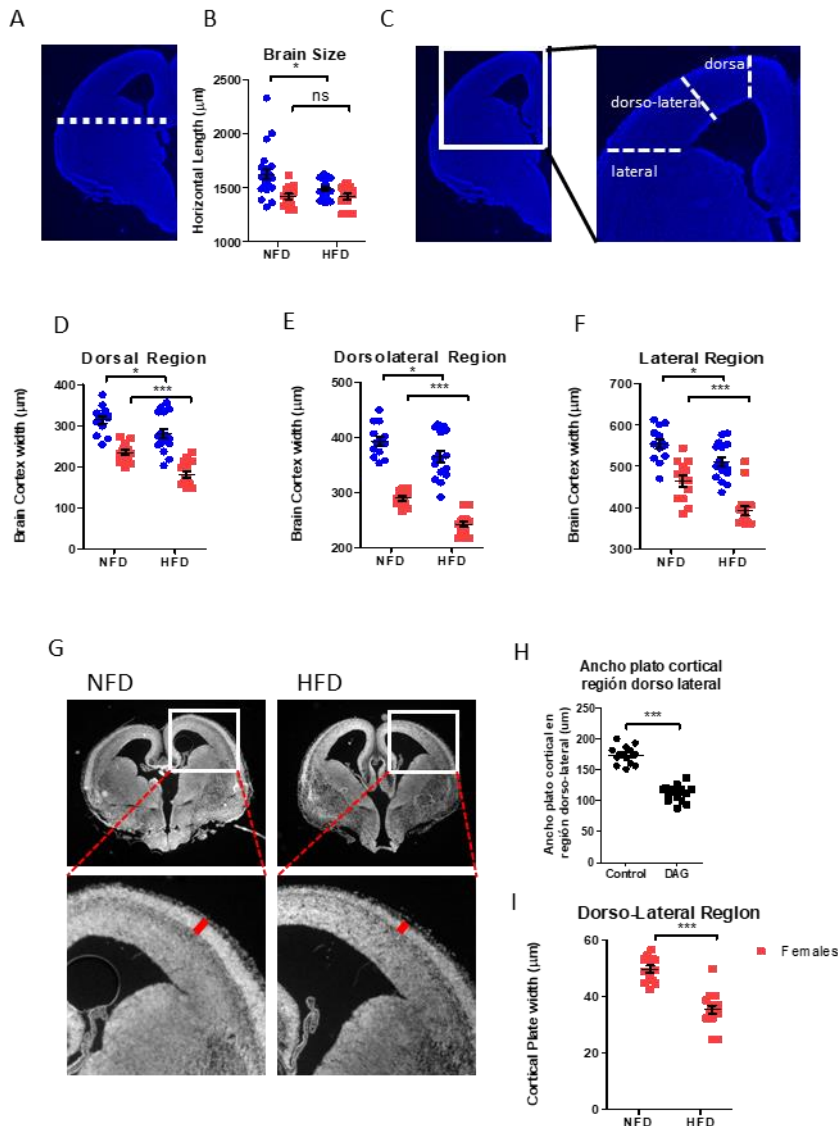
**Figura 5. La mHFD altera a los progenitores intermedios al E15.** A) Tinción inmunohistoquímica para PAX6, TBR2, PHH3, en ambas condiciones para machos (fila superior) y hembras (fila inferior) B) cuantificación de células PAX6+ C) cuantificación de células TBR2+ D) cuantificación de dobles positivos TBR2/PAX6 E) Cuantificación de células PHH3+ F) Tinción inmunohistoquímica para TBR1 y TBR2, machos mostrados en la fila superior y hembras mostradas en la fila inferior G) Cuantificación de células TBR1+. N es el número de cortes utilizados para cada análisis (N ≥ 15) para cada condición. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 \*\*\*: p<0.001

**Tabla V.** La mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E15.

Marcadores	Machos		p	TE	Hembras		p	TE
	NFD	HFD			NFD	HFD		
PAX6	730.4 ± 15.01	722.5 ± 13.96	0,7005	0,019	723.0 ± 11.62	728.3 ± 16.08	0,7906	-0.08
TBR2	395.0 ± 14.03	361.8 ± 5.920	0,0415	0,74	373.5 ± 6.388	337.7 ± 6.555	0,0004	<b>1,20</b>
PHH3	30.13 ± 1.289	23.67 ± 1.060	0,0004	1,178	37.00 ± 1.775	33.70 ± 1.404	0,1530	0,45
TBR1	342.8 ± 7.980	307.6 ± 9.775	0,0087	<b>0,924</b>	322.8 ± 7.090	296.7 ± 8.467	0,0258	<b>0,85</b>

Células positivas para marcadores inmunohistoquímico expresados en media ± error estándar para cada una de las condiciones analizadas y según sexo. Nota: p value. TE: tamaño del efecto.

Teniendo en cuenta las alteraciones en las poblaciones celulares que ocurrieron en esta etapa, proseguimos con el análisis morfológico cerebral al E15 (Figura 6). En machos y hembras, el ancho de la corteza dorsal (Figura 6D), dorsolateral (Figura 6E) y lateral (Figura 6F) disminuyó en la descendencia de las ratonas expuestas a una HFD en el modelo corto en comparación con la dieta control. En ambos sexos, se evidenció una disminución del ancho del plato cortical (Figura 6G-I), reflejando la disminución de neuronas generadas en el análisis de inmunohistoquímica. Sin embargo, la disminución del tamaño cerebral sólo se evidenció en los machos de aquellas madres expuestas a una HFD (Figura 6A).

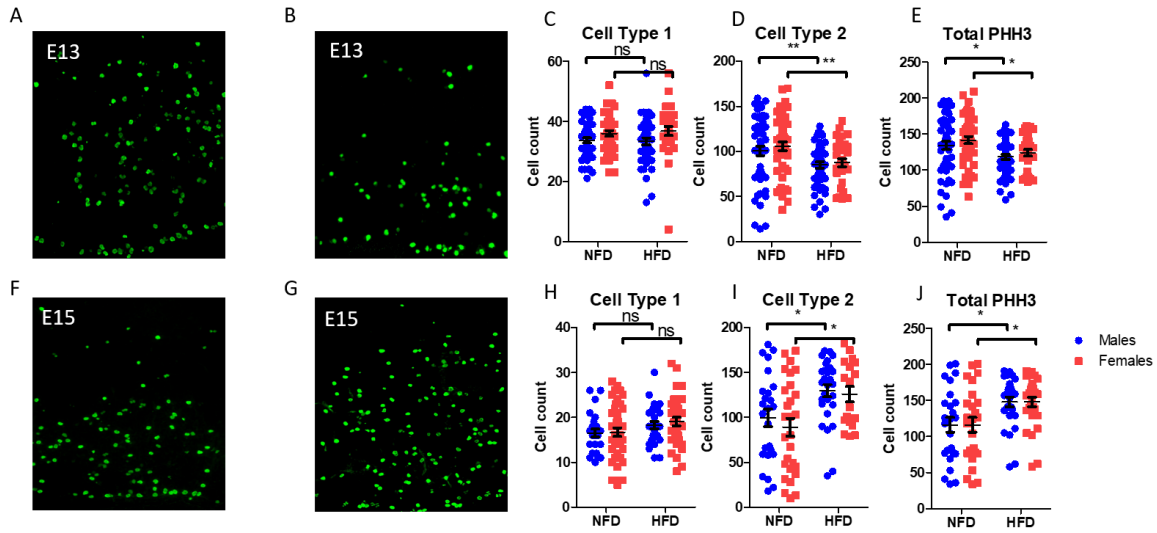


**Figura 6. Una mHFD afecta la morfología cerebral al día E15.** A) Corte ilustrativo con línea de referencia para el cálculo de la longitud horizontal de un hemisferio. B) Cuantificación del tamaño cerebral basándose en la longitud horizontal de los hemisferios C) Ilustración de las líneas utilizadas para el cálculo del ancho de la corteza en la región lateral, dorsolateral y dorsal. D) Cuantificación del ancho de la corteza en la región dorsal. E) Cuantificación del ancho de la corteza en la región dorsolateral. F) Cuantificación del ancho de la corteza en la región lateral G) Imagen que muestra la línea utilizada para el cómputo del ancho del plato cortical de la región dorsolateral. H) Cuantificación del ancho del plato cortical de la región dorsolateral en machos I) Cuantificación del ancho del plato cortical de la región dorsolateral en hembras. N es el número de cortes utilizados para cada análisis ( $N \geq 15$ ) para cada condición. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

### **La dieta alta en grasa materna altera la dinámica de los progenitores ubicados en el subpallium**

Hasta aquí el foco de la investigación estuvo en la neurogénesis dorsal. Sin embargo, nos preguntamos si similares alteraciones existirían en los procesos que ocurren en el subpallium. A E15, en esta región ocurre la proliferación de células que posteriormente originarán interneuronas y migrarán a la corteza cerebral. La figura 7 muestra el marcaje de células positivas a PHH3 en la eminencia media, así como su respectiva cuantificación en E13 (Figura 7 A-E) y E15 (Figura 7 F-J). Mientras que las células cuantificadas en el E13 serán las que mayoritariamente darán origen a las interneuronas que expresan somatostatina: en el E15 proliferan las células que mayoritariamente darán origen a un grupo importante de interneuronas que expresan parvalbúmina. En cuanto al número de células proliferativas totales (Figura 7 E) marcadas con PHH3 en el E13 se evidenció una disminución en la situación experimental con respecto al control tanto en machos ( $134.9 \pm 4.977$  N=66 vs  $118.3 \pm 3.568$  N=49,  $p = 0,0080$ ) como en hembras ( $141.6 \pm 4.991$  N=46 vs  $124.2 \pm 4.545$  N=32,  $p = 0,0117$ ). Al segmentar estas células proliferativas totales en cuanto a su ubicación de acuerdo con las que se encuentran en el borde ventricular (Tipo 1) y las que no (Tipo 2), como resultado se obtuvo que no hubo diferencias significativas en las células Tipo 1 (Figura 7 C) en machos ( $33.24 \pm 0.8561$  N=66 vs  $33.33 \pm 1.137$  N=49,  $p=0,9530$ ) ni en hembras ( $35.93 \pm 0.8957$  N=46 vs  $36.81 \pm 1.487$  N=32,  $p=0,6153$ ). Mientras que en las células proliferativas tipo 2 (Figura 7 D) se observó una disminución en la situación experimental si lo comparamos con el control, un efecto que se observó tanto en machos ( $101.6 \pm 4.579$  N=66 vs  $85.02 \pm 3.534$  N=49,  $p=0.0049$ ) como en hembras ( $105.7 \pm 4.971$  N=46 vs  $87.38 \pm 4.439$  N=32,  $p=0,0075$ ).

Por otra parte, se realizó el mismo análisis en la eminencia media en el E15 (Figura 7 F-J) constatándose resultados distintos a los observados en el E13. Comenzando por las células marcadas con PHH3 totales (Figura 7 J) se observó que hubo un aumento en la situación experimental vs la situación control afectándose tanto machos ( $116.1 \pm 10.37$  N=25 vs  $147.9 \pm 6.631$  N=28,  $p=0,0136$ ) como hembras ( $108.6 \pm 8.534$  N=45 vs  $139.1 \pm 6.587$  N=35,  $p =0.0060$ ). Continuando con la cuantificación de las células tipo 1 (Figura 7 H) no se observó diferencia significativa ni en hembras ( $16.69 \pm 0.9346$  N=45 vs  $19.06 \pm 0.9658$  N=35,  $p=0,0821$ ) ni en machos ( $16.52 \pm 0.8890$  N=25 vs  $18.29 \pm 0.8243$  N=28,  $p=0.15$ ). En cuanto a las células tipo 2 (Figura 7 I), se observó que las células proliferativas aumentaron en la descendencia de madres expuestas a una dieta alta en grasa tanto en machos ( $99.60 \pm 9.929$  N=25 vs  $129.6 \pm 6.838$  N=28,  $p=0,0169$ ) como en hembras ( $91.93 \pm 7.942$  N=45 vs  $120.0 \pm 6.506$  N=35,  $p=0,0077$ ).

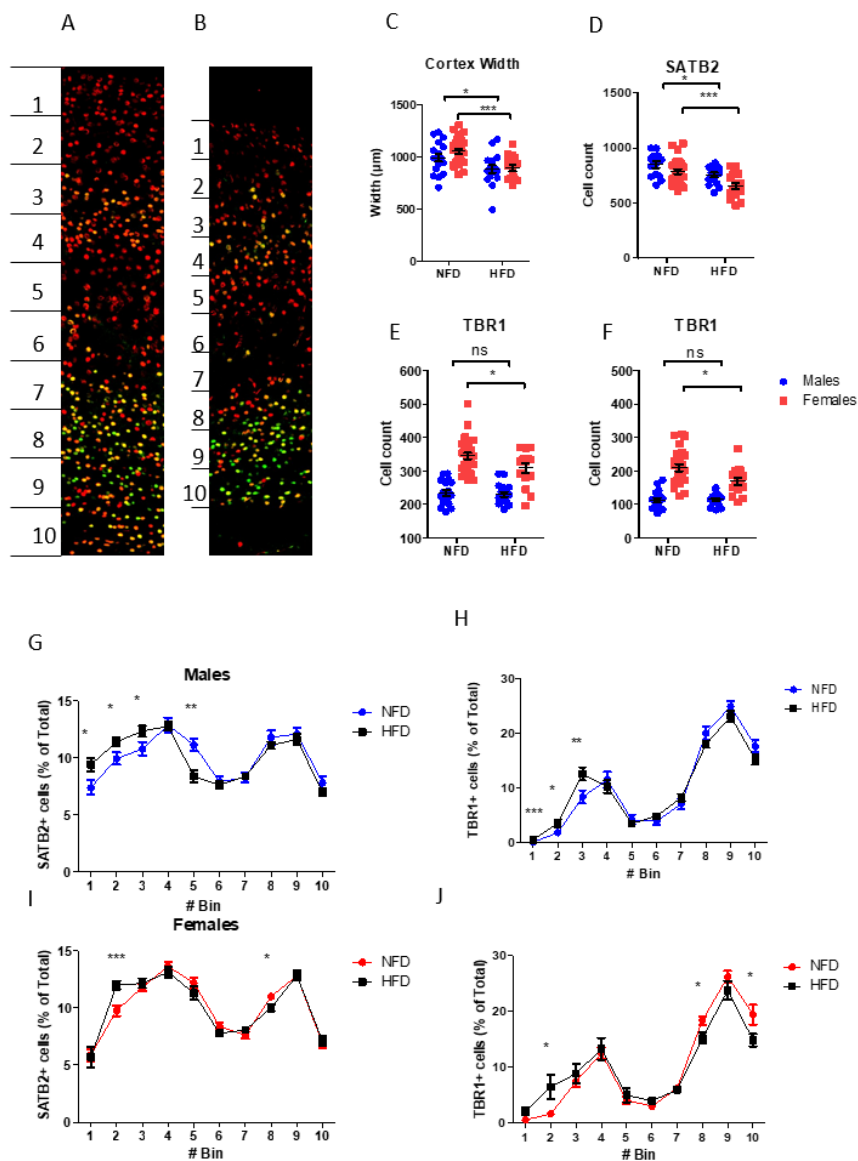


**Figura 7. La dieta materna alta en grasa altera la proliferación de células en la eminencia media tanto en E13 como E15.** La fila superior A-E e inferior F-J muestran los resultados encontrados a E13 y E15 respectivamente. A-B) Inmunohistoquímica de la eminencia media de secciones coronales en el E13. F-G) Inmunohistoquímica de la eminencia media de secciones coronales a E15. C, H) Cuantificación de células positivas para PHH3 que se encuentran en el borde apical. D, I) Cuantificación de células positivas a PHH3 que se encuentran fuera del borde apical. E, J) Cuantificación de células positivas para PHH3 total. N es el número de cortes utilizados para el análisis ( $N \geq 15$ ) de cada condición. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

### **Los efectos de la dieta alta en grasa materna se manifiestan al nacer con la alteración del tamaño y distribución de las poblaciones neuronales**

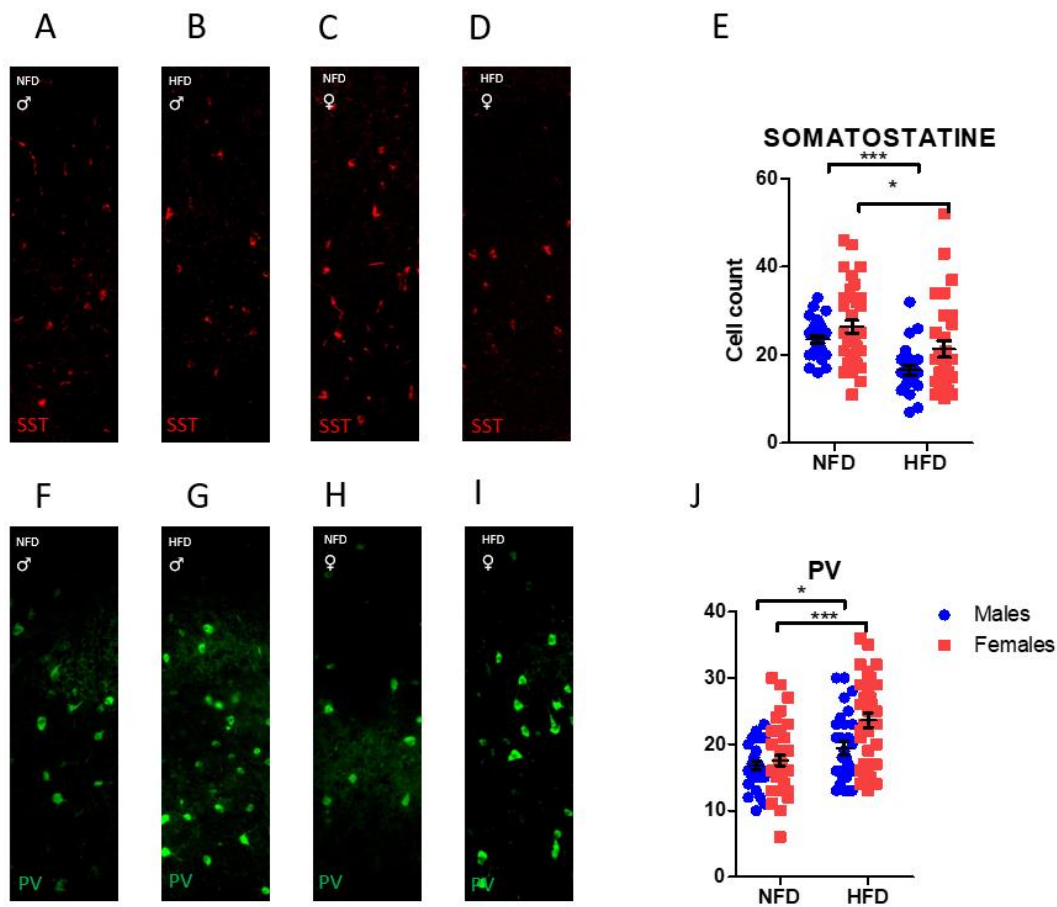
Teniendo en cuenta los efectos de la mHFD sobre los progenitores neuronales además del proceso de neurogénesis que aconteció hasta el E15 nos preguntamos sobre los efectos de esta intervención en la corteza cerebral posnatal. Para entender esto, se dio una HFD desde el apareamiento hasta E15 y luego se cambió la dieta por una dieta control hasta el fin del experimento. Para evaluar el resultado de esta intervención, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica contra las principales poblaciones neuronales excitatorias. Se usó TBR1: el mismo que en el período prenatal y SATB2, factor de transcripción expresado en neuronas excitatorias de capas superiores, pero distribuido en todo el ancho la corteza cerebral en el P14.

La figura 8 muestra el análisis de inmunohistoquímica para células positivas a SATB2 Y TBR1, así como la segmentación de la corteza cerebral en bins de las crías en el P14 en una intervención corta de dicha dieta. Comenzando con las células positivas a SATB2 se observó una reducción significativa en ambos sexos en la situación experimental con respecto al control (Figura 8 C) en machos ( $847.9 \pm 28.87$  N=14 vs  $753.9 \pm 21.37$  N=15;  $p=0.0151$ ) como en hembras ( $783.7 \pm 23.26$  N=25 vs  $655.1 \pm 28.98$  N=15;  $p=0.0016$ ). Segmentando la corteza cerebral (Figura 8G) se encontró que en los cerebros de los machos hubo un aumento de SATB2 en proporción al total de células SATB2+ en bins #1, 2 y 3, disminuyendo en el bin #5. Mientras, en las hembras, este aumento ocurrió en el bin #2 acompañado de una disminución significativa de células presentes en el bin #8 (Figura 8H). En el resto de los bins no hubo diferencias significativas. Continuando con la cuantificación de la población neuronal que expresa TBR1 (Figura 8 E-F) se encontró que ocurrió una disminución en el número de células en la corteza cerebral de las hembras de madres expuestas a una dieta alta en grasa durante el embarazo y no en los machos (Figura 8E). Sin embargo, si se analizan las células TBR1+ presentes en las capas más profundas de la corteza (Figura 8F), la disminución está presente en las crías, tanto hembras como machos, de madres expuestas a HFD. La disminución de esta población afectó la distribución de estas células al dividir la corteza cerebral en bins. Hubo un aumento de células TBR1+ en los bins # 1, 2, 3 en los machos de madres expuestas a HFD (Figura 8I). Mientras que en las hembras expuestas a mHFD se encontró un aumento en proporción del total de células TBR1+, en los bins # 2 y una disminución en los bins # 8 y 10 (Figura 8J).



**Figura 8. La dieta materna alta en grasa modifica el número de células excitatorias presentes en la corteza cerebral de la descendencia en el P14.** A-B) Inmunohistoquímica de la corteza cerebral en cortes coronales contra SATB2 y TBR1. C) Ancho de la corteza cerebral D) Cuantificación de neuronas excitatorias que expresan SATB2. E) Cuantificación de neuronas positivas a TBR1 en todas las capas de la corteza F) Cuantificación de células TBR1 positivas en las 2 capas inferiores de la corteza cerebral. G-H) Cuantificación del número de células positivas para SATB2 dividiendo la corteza cerebral en 10 bins. I-J) Cuantificación por bins de células positivas a TBR1 de la corteza cerebral. N es el número de cortes utilizados en cada análisis ( $N \geq 15$ ) por condición. \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$

En los circuitos corticales son más abundantes las neuronas excitatorias, pero las neuronas inhibitorias, llamadas también interneuronas, se encargan de regular el circuito y por tanto juegan un papel fundamental en el correcto funcionamiento de estos. En cuanto a las interneuronas se refiere, en este estudio se analizó la proliferación de las células que localizándose en la eminencia media en el período embrionario migrarían hacia la corteza donde formarán los circuitos antes mencionados. Por tanto, se estudiaron las poblaciones de interneuronas más importantes localizadas en la corteza cerebral. En la figura 9 se observa el análisis de imágenes de microscopia usando inmunohistoquímica de las interneuronas presentes en la corteza cerebral de cortes coronales realizados a nivel de la corteza somatosensorial en el P14 en la descendencia de madres expuestas a una dieta control o alta en grasa. En los paneles superiores (Figura 9 A-D) se observa el análisis de las interneuronas que expresan somatostatina. La cuantificación de esta población celular (Figura 9E) reveló que en la situación experimental hubo una disminución significativa en tanto en machos ( $23.52 \pm 0.8513$  N=27 vs  $16.57 \pm 1.186$  N=23,  $p < 0.0001$ ) como hembras ( $26.39 \pm 1.447$  N=38 vs  $21.33 \pm 1.882$  N=30,  $p=0.034$ ). También se analizó otra población de interneuronas: las que expresan parvalbúmina (Figura 9 F-I). Como resultado de la cuantificación (Figura 9J), dicha población se encontró aumentada tanto en machos ( $16.93 \pm 0.6583$  N=29 vs  $19.31 \pm 0.8974$  N=32,  $p=0,0368$ ) como en hembras ( $17.56 \pm 0.8013$  N=39 vs  $23.59 \pm 1.094$  N=37,  $p < 0.0001$ ).

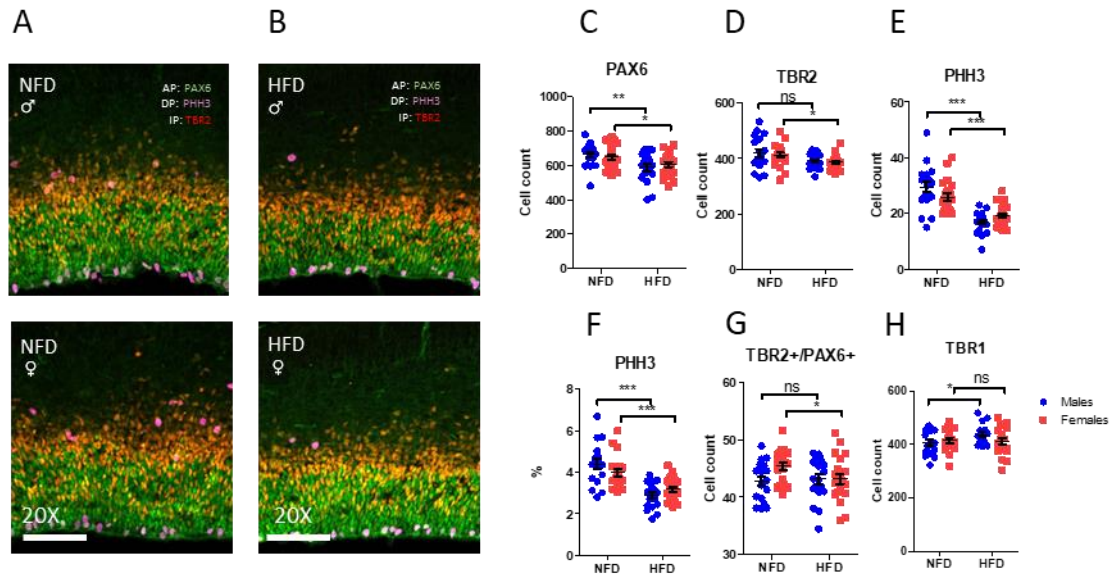


**Figura 9. La dieta materna alta en grasa modifica el número de interneuronas presentes en la corteza cerebral de la descendencia en el período posnatal.** En la fila superior se analiza las interneuronas que expresan somatostatina y en la fila inferior se observa el análisis de las interneuronas que expresan parvalbúmina. A-D) Inmunohistoquímica para somatostatina de la corteza cerebral en secciones coronales. E) cuantificación de neuronas que expresan somatostatina. F-I) Inmunohistoquímica para parvalbúmina de la corteza cerebral en secciones coronales. J) cuantificación de neuronas que expresan parvalbúmina. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

**Los efectos de una mHFD sobre el desarrollo de la corteza cerebral de la descendencia dependen del tiempo de exposición a esta.**

Hasta ahora hemos analizado los efectos de una dieta materna alta en grasa por un período agudo desde el inicio del embarazo en el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria y sus consecuencias para la etapa posnatal. Ahora bien, cabe preguntarnos: ¿este efecto será diferente si extendemos la dieta materna alta en grasa 4 semanas o incluso 10 semanas antes del embarazo. Aunque se sabe que los hábitos alimentarios pueden alterarse durante el embarazo también es una condición prevalente la presencia de obesidad antes del embarazo.

Para responder esta pregunta se decidió realizar el mismo análisis de la etapa embrionaria. Comenzando con una exposición de una dieta materna alta en grasa que comenzó 4 semanas antes del apareamiento, se logró el análisis de los progenitores apicales, intermediario y las primeras neuronas recién generadas, lo que se muestra en la figura 10 y tabla V. De manera destacable, una exposición prolongada a una dieta materna alta en grasa alteró la dinámica de los progenitores y la formación de nuevas neuronas. En detalle, los progenitores apicales disminuyeron en la descendencia de las madres expuestas a una HFD en ambos sexos (Figura 10 C) mientras que en el caso de los progenitores intermediarios (Figura 10 D) se observó que hubo una disminución significativa en las hembras expuestas a una mHFD, pero no en los machos. Se asoció a la reducción del número de doble positivos TBR2/PAX6 en las hembras por la situación experimental y no en los machos (Figura 10 G), mientras que las células que proliferaban marcadas con PHH3 (Figura 10 E-F) bajaron tanto el número como el valor normalizado por la población de PHH3 en ambos sexos. Sin embargo, si cuantificamos el número de NN, encontramos que sólo en los machos hubo diferencias significativas, obteniéndose que los machos expuestos a una mHFD presentaron un aumento en el número de NN, mientras que las hembras no hubo diferencias significativas.



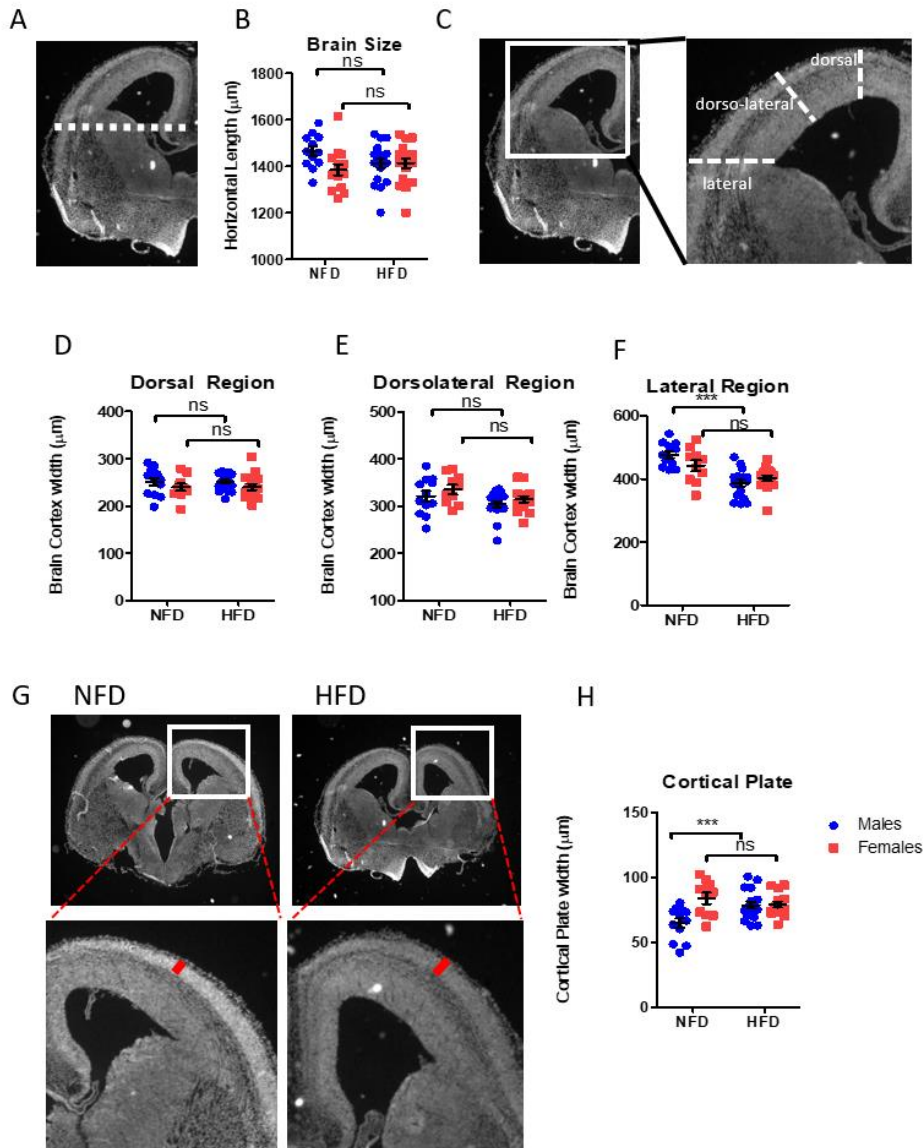
**Figura 10.** La exposición prolongada (1 mes antes de la estera) a un mHFD altera adicionalmente la dinámica de las células progenitoras y la neurogénesis en E15. A-B) Inmunotinción de cortes corticales coronales en E15. C) Cuantificaciones de PAX6 y PHH3 para hombres y mujeres. D) cuantificación de células TBR2 positivas. E) cuantificación de células PHH3 positivas. F) cuantificación de células PHH3 positivas en porcentaje (%) G) cuantificación de doble marcaje con TBR2 y PAX6 expresadas como porcentaje de PAX6. H) cuantificación de TBR1 ( $p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ;  $n = 3$ ).

**Tabla VI.** La exposición prolongada (1 mes antes del apareamiento) a una mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E15.

Marcadores	Machos		p	TE	Hembras		p	TE
	NFD	HFD			NFD	HFD		
PAX6	663.2 ± 16.39	587.9 ± 19.55	0,0057	<b>0.944</b>	648.7 ± 13.71	604.8 ± 14.90	0,0361	<b>0.657</b>
TBR2	418.6 ± 13.99	390.6 ± 5.943	0,0797	0.603	413.0 ± 8.739	386.0 ± 5.500	0,0132	<b>0.793</b>
PHH3	29.39 ± 1.908	16.95 ± 0.8802	< 0.0001	1.939	25.81 ± 1.243	19.14 ± 0.8318	< 0.0001	1.349
TBR1	406.7 ± 10.31	436.9 ± 10.12	0,0452	<b>-0.706</b>	415.4 ± 10.10	411.9 ± 13.05	0,8349	0.069

Nota: Células positivas para marcadores inmunohistoquímico expresados en media ± error estándar para cada una de las condiciones analizadas y según sexo. p value. TE: tamaño del efecto. Los marcadores utilizados corresponden a PAX6: progenitores apicales, TBR2: progenitores intermediarios, PHH3: marcador de proliferación celular, TBR1: neuronas recién generadas.

Para complementar el estudio se decidió analizar la morfología cerebral (Figura 11). En cuanto al tamaño cerebral medido por la longitud horizontal de los hemisferios no se observaron diferencias significativas en ambas situaciones. El ancho de la corteza cerebral en la región dorsal ni dorsolateral presentó cambio significativo en ninguno de los sexos cuando se comparó la descendencia de madres expuestas a una dieta alta en grasa con relación a las madres que recibieron una dieta control. Sin embargo, en la región lateral hubo una disminución significativa en la descendencia masculina de madres expuestas a una dieta alta en grasa con respecto al control, pero no en las hembras, aunque en esta última hubo una tendencia a disminuir, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por último, en el plato cortical hubo un aumento en el ancho en los machos obtenidos de la situación experimental mientras que en las hembras no hubo diferencias significativas entre ambas situaciones. Estos resultados sugieren que una los efectos de una mHFD prolongada son diferentes con relación a una intervención aguda durante el embarazo, con mecanismos celulares totalmente distintos.



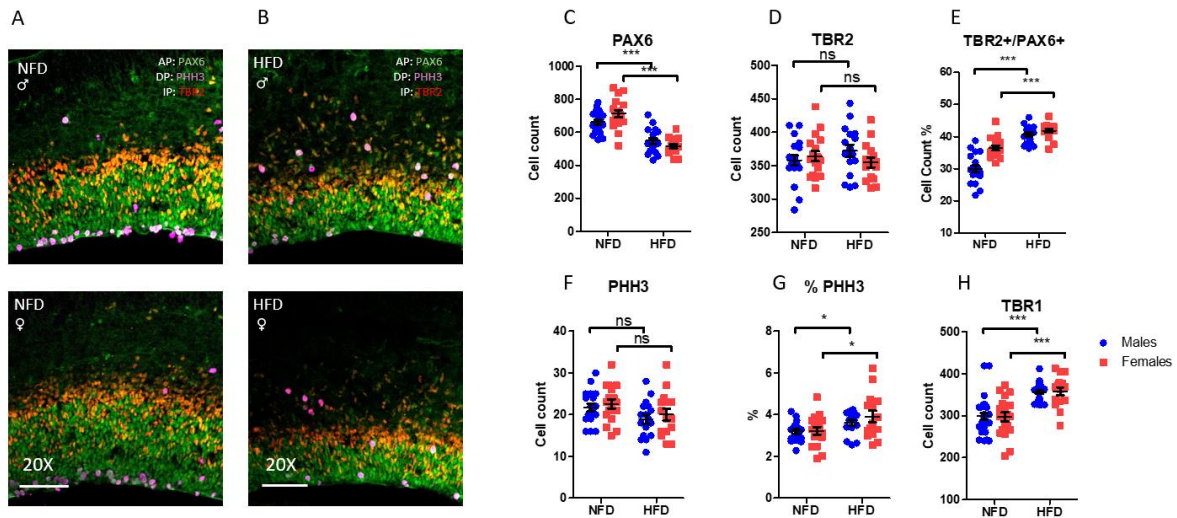
**Figura 11. Una mHFD prolongada 1 mes antes del apareamiento afecta la morfología cerebral al día E15.**

A) Corte ilustrativo con línea de referencia para el cálculo de la longitud horizontal de un hemisferio. B) Cuantificación del tamaño cerebral basándose en la longitud horizontal de los hemisferios C) Ilustración de las líneas utilizadas para el cálculo del ancho de la corteza en la región lateral, dorsolateral y dorsal. D) Cuantificación del ancho de la corteza en la región dorsal. E) Cuantificación del ancho de la corteza en la región dorsolateral. F) Cuantificación del ancho de la corteza en la región lateral G) Imagen que muestra la línea utilizada para el cómputo del ancho del plato cortical de la región dorsolateral. H) Cuantificación del ancho del plato cortical de la región dorsolateral.

### **Diez semanas de tratamiento con una HFD previos al embarazo aumentan los efectos observados sobre el desarrollo de la corteza cerebral**

Los efectos sobre el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria producto de una exposición prolongada, 10 semanas antes del apareamiento, de una dieta materna alta en grasa se muestra en la Figura 12 y la cuantificación se observa en la tabla VI. Los progenitores apicales marcados con PAX6 (Figura 12 C) disminuyeron significativamente si comparamos la situación experimental con el control en ambos sexos (Machos:  $660.4 \pm 15.40$  N=19 vs  $547.9 \pm 18.18$  N=17,  $p < 0.0001$ ; Hembras:  $712.0 \pm 22.29$  N=17 vs  $516.1 \pm 13.27$  N=15,  $p < 0.0001$ ). En cuanto a los progenitores intermediarios (TBR2 positivos, Figura 12 D), no se encontraron diferencias significativas (Machos:  $332.0 \pm 7.587$  N=19 vs  $338.9 \pm 8.147$  N=17,  $p < 0.001$ ); Hembras:  $364.1 \pm 7.646$  N=17 vs  $354.7 \pm 7.450$  N=15,  $p = 0,3866$ ). Sin embargo, cuando se analizaron las células doble positivas para TBR2/PAX6 (Figura 12 E), se observó un aumento de estas en la situación experimental en ambos sexos (Machos:  $30.00 \pm 1.045$  N=19 vs  $40.62 \pm 0.7257$  N=16,  $p < 0.0001$ ; Hembras  $36.48 \pm 0.7563$  N=17 vs  $41.83 \pm 0.6369$  N=15,  $p < 0.0001$ ). La cuantificación de células marcadas con PHH3 (Figura 12 F) no arrojó diferencias significativas (Macho:  $21.68 \pm 0.8985$  N=19 vs  $18.94 \pm 1.066$  N=17  $p = 0,0578$ ; Hembras:  $22.59 \pm 1.085$  N=17 vs  $20.07 \pm 1.385$  N=15,  $p = 0,1633$ ), pero cuando esta es normalizada usando la población de PAX6 (Figura 12 G), como resultado se encontró que estas células están aumentadas en ambos sexos (Machos:  $3.191 \pm 0.1097$  N=18 vs  $3.609 \pm 0.1369$  N=16  $p = 0,0238$ ; Hembras:  $3.223 \pm 0.1807$  N=17 vs  $3.911 \pm 0.2800$  N=15,  $p = 0,0500$ ). Por último, se analizó las neuronas recién generadas marcadas con TBR1 (Figura 12 H); se observó que esta población se encontró aumentada tanto en machos ( $301.4 \pm 10.92$  N=16 vs  $359.6 \pm 5.762$  N=18,  $p < 0.0001$ ) como en hembras ( $286.1 \pm 11.59$  N=19 vs  $339.4 \pm 11.50$  N=14  $p < 0.0001$ ) en los embriones de madres expuestas a una dieta alta en grasa.

En cuanto al tamaño del efecto de la mHFD de la descendencia (tabla VI), calculada por la *h* de Hedge se observó que los AP en los machos tuvieron un tamaño de efecto grande ( $h = 1.54$ ) y en las hembras un tamaño de efecto mediano ( $h = 0.55$ ). Los IP, mostraron un tamaño de efecto pequeño tanto en hembras ( $h = 0.35$ ) como en machos ( $h = -0.41$ ) además de inverso puesto que son de signos contrarios. Las células positivas a PHH3, se observó un efecto mediano en los machos ( $h = 0.64$ ) y pequeño en las hembras ( $h = 0.35$ ). La mHFD tuvo un efecto muy grande y negativo, lo que implica que la descendencia expuesta a mHFD tuvo una media mayor que la expuesta a una dieta control, tanto en machos ( $h = -1.6$ ) como en hembras ( $h = -1.4$ )



**Figura 12. La exposición prolongada a una dieta materna alta en grasa por 10 semanas antes del embarazo altera la dinámica de los progenitores y la generación de nuevas neuronas.** A-B) Inmunohistoquímica de secciones coronales de la corteza cerebral al E15. C) Cuantificación de PAX6 para machos y hembras. D) cuantificación para células positivas a TBR2 E) cuantificación de células doble positivas para TBR2 Y PAX6. F) Cuantificación a células positivas a PHH3 G) Porcentaje de células positivas a PHH3 del total de PAX6. H) Cuantificación de neuronas recién generadas, N>= 15).

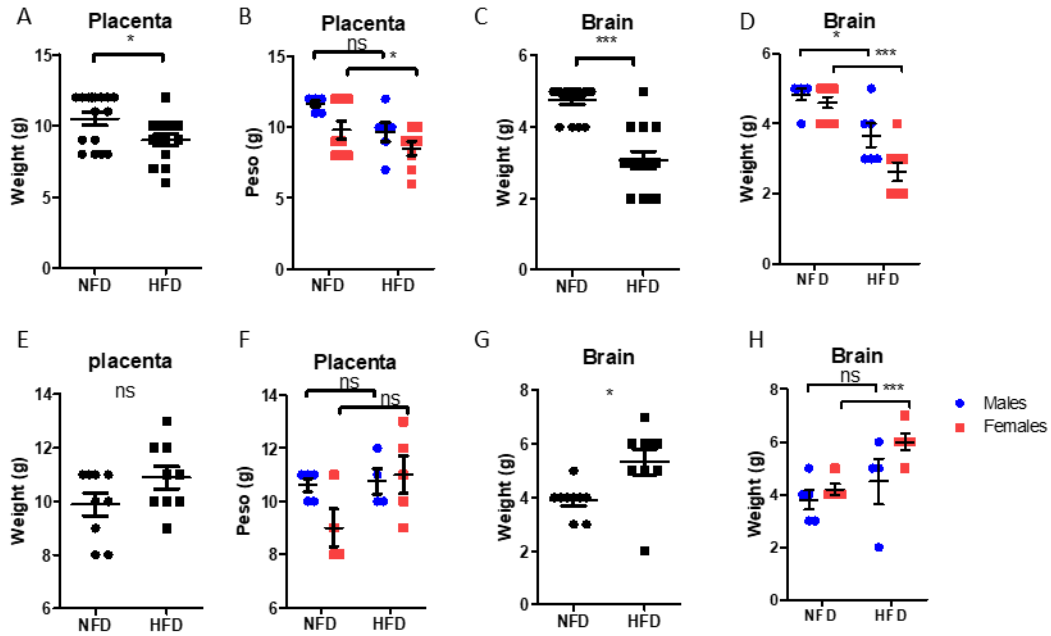
**Tabla VII.** La exposición prolongada (10 semanas antes del apareamiento) a una mHFD tiene un efecto diferencial en ambos sexos al E15.

Marcadores	Machos		p	TE	Hembras		p	TE
	NFD	HFD			NFD	HFD		
PAX6	660.4 ± 15.39	547.88 ± 18.18	<0.0001	<b>1.54</b>	712 ± 22.28	516.06 ± 13.26	< .001	0.551
TBR2	357.84 ± 7.5	372.35 ± 8.7	0.218	-0.411	364.11 ± 7.6	354.73 ± 7.45	0.386	0.349
PHH3	21.68 ± 0.8	18.94 ± 1.06	0.058	0.644	22.58 ± 1.08	20.06 ± 1.38	0.163	0.355
TBR1	301.4 ± 10.92	359.6 ± 5.762	<0.0001	<b>-1.606</b>	286.1 ± 11.59	339.4 ± 11.50	< .0001	<b>-1.4</b>

Nota: Células positivas para marcadores inmunohistoquímico expresados en media ± error estándar para cada una de las condiciones analizadas y según sexo. p value. TE: tamaño del efecto. Los marcadores utilizados corresponden a PAX6: progenitores apicales, TBR2: progenitores intermediarios, PHH3: marcador de proliferación celular, TBR1: neuronas recién generadas.

### **La mHFD afecta el peso de la placenta y el cerebro dependiendo del tiempo de exposición**

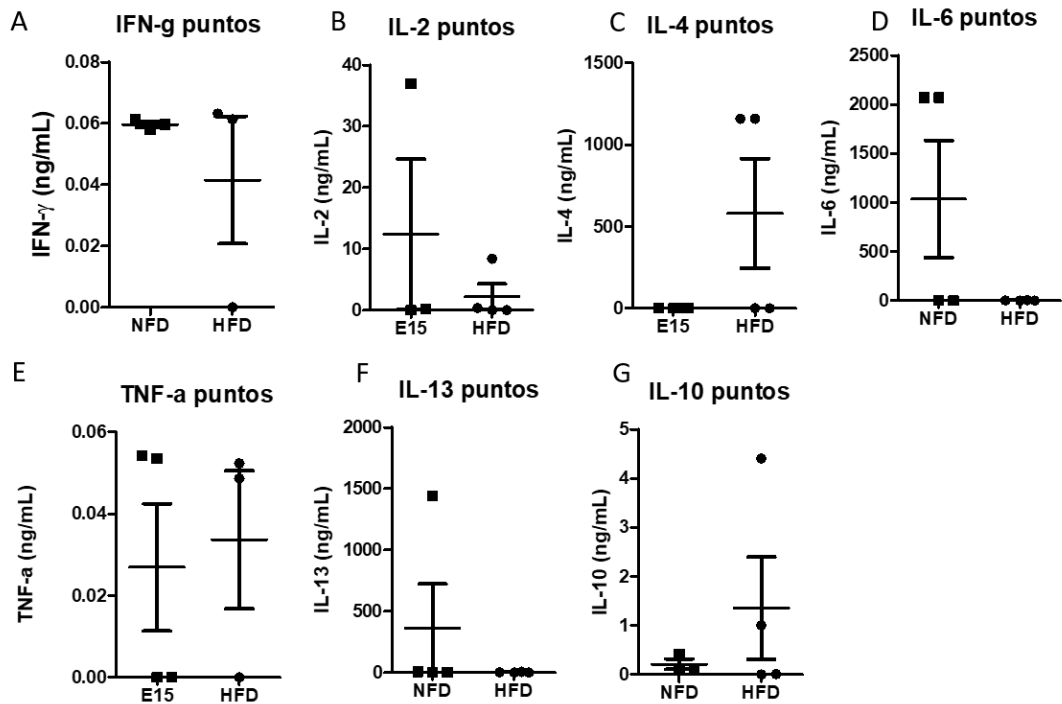
La figura 13 muestra el peso placentario y cerebral de la descendencia de madres expuestas a una dieta alta en grasa en 2 de los modelos estudiados: intervención corta (15 días) y la intervención más prolongada (10 semanas antes del apareamiento). El peso de la placenta en el modelo corto disminuyó en la descendencia de madres expuestas a HFD con respecto a la descendencia de madres expuestas a una dieta normal. Si separamos el sexo de la descendencia vemos que en el caso de las hembras disminuyó el peso significativamente, no así en los machos, pero la tendencia a disminuir es clara. En cuanto al peso del cerebro se observó, que, en este modelo corto, disminuyó significativamente el peso del cerebro (Figura 13 C) y en ambos sexos se pudo constatar dicha disminución (Figura 13 D). Con respecto al modelo prolongado, se observó el fenómeno contrario: si bien no hubo diferencia significativa en el peso placentario juntando los embriones de ambos sexos ni separándolos, si se observa una tendencia al aumento del peso placentario en la descendencia expuesta a mHFD. En cuanto al peso cerebral en este modelo prolongado, se observó que juntando ambos sexos se obtuvo un aumento en el peso cerebral de aquellos cerebros expuestos a una mHFD. Sin embargo, al separarlos por sexo obtuvimos que solo en las hembras el aumento fue significativo, pero en los machos se observó una tendencia al aumento.



**Figura 13. La dieta alta en grasa materna altera el peso placentario y del cerebro de la descendencia.** En los paneles superiores A-D, se muestran los resultados respecto al modelo de intervención de 15 días mientras en los paneles inferiores E-H se muestran los resultados correspondientes al modelo que comenzó 10 semanas antes del apareamiento. A, E) Peso placentario de ambos sexos B, F) peso placentario separado por sexo C, G) Peso del cerebro de la descendencia D, H) Peso del cerebro de la descendencia separado por sexo (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , N representa cada embrión)

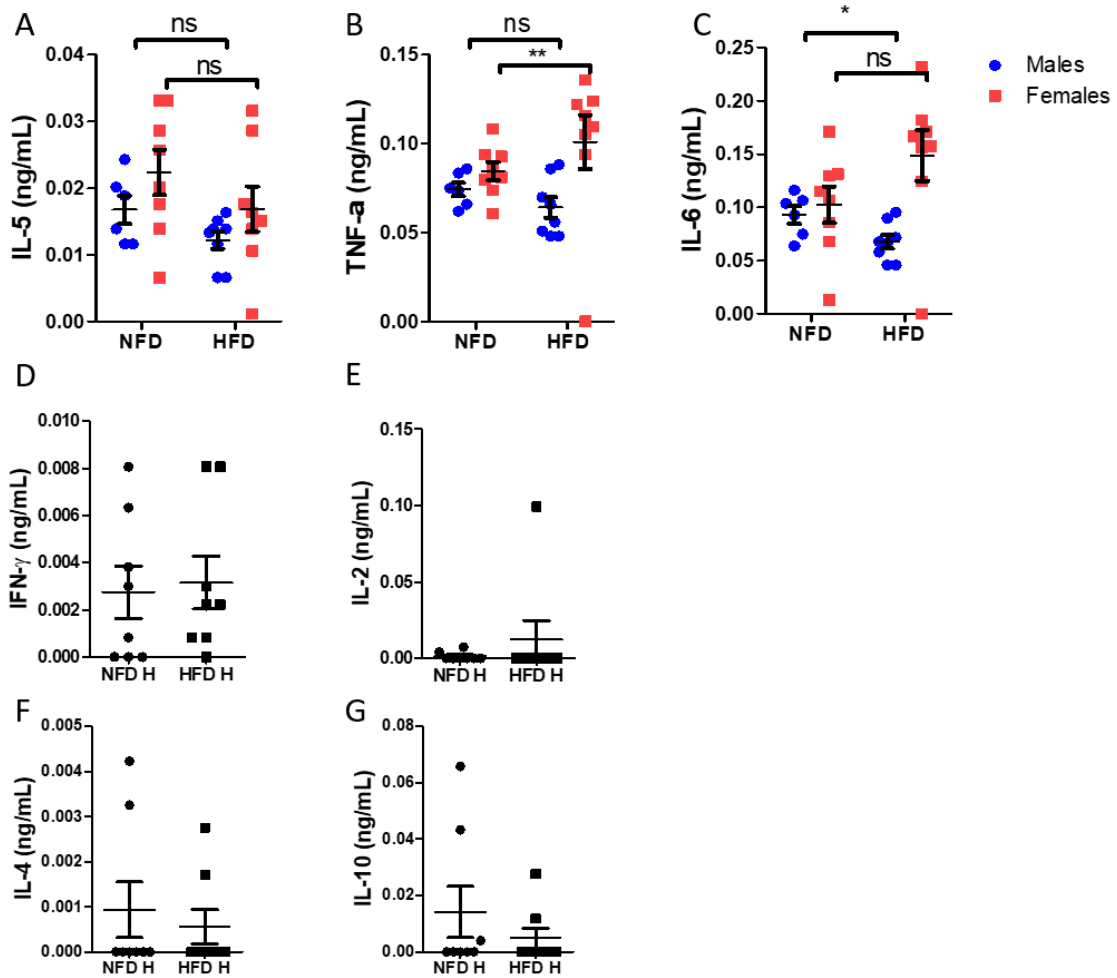
### **HFD y estado inflamatorio**

En busca de un mecanismo que estuviera mediando el efecto de la HFD sobre el desarrollo de la corteza cerebral, se optó por analizar distintas citoquinas tanto en el plasma de las madres como en la placenta. La figura 14 muestra los niveles de IFN-g, IL-5, TNF-a, IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, y IL-13 en el suero materno de las ratonas expuestas ya sea a una NFD o HFD por 15 días desde el momento del apareamiento. Desafortunadamente no hubo suficientes puntos para realizar un análisis estadístico. Sin embargo, se apreció una disminución de la IL-2, IL-6 y la IL-13; además de una tendencia al aumento de la IL-4 y la IL-10.



**Figura 14. Citocinas en suero materno de la intervención aguda (15 días).** A) Niveles de IFN-gamma B) niveles de IL-2 C) niveles de IL-4 D) niveles de IL-6 E) niveles de TNF- $\alpha$  F) niveles de IL-13 G) niveles de IL-10.

La producción de citoquinas se ha demostrado que contribuye al desarrollo y función normales tanto de la placenta fetal como del cerebro. Por lo tanto, hipotetizamos que el consumo de una dieta alta en grasas induciría cambios en la expresión de citocinas en el tejido placentario de la descendencia. Dividimos el tejido placentario entre las crías hembras y machos, basándonos en los efectos sexualmente dismórficos observados en el cerebro. De las 8 citocinas, solo se detectaron **IL-5**, **TNF- $\alpha$**  e **IL-6** tanto en hembras como en machos (Figura 15). No se observaron cambios significativos en los niveles de IL-5 entre el grupo de dieta normal y el grupo de alta grasa (Figura 15 A). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de **TNF- $\alpha$**  ( $p < 0.01$ ) en las crías hembras de madres alimentadas con una dieta alta en grasas en comparación con las madres alimentadas con una dieta normal, sin cambios significativos en las crías machos (Fig. 15 B). Además, los niveles de **IL-6** disminuyeron significativamente en las crías machos de madres alimentadas con una dieta alta en grasas en comparación con las madres que recibieron una dieta normal, sin cambios significativos en las crías hembras (Fig. 15 C). Cabe destacar que **IFN- $\gamma$** , **IL-2**, **IL-4** e **IL-10** solo se detectaron en el tejido placentario de las crías hembras (Fig D-G). No se detectó expresión de **IL-13** en el tejido placentario de ninguna de las muestras.



**Figura 15. Niveles de citoquinas en la placenta.** La fila superior (A-C) representa los niveles de citoquinas encontradas en ambos sexos. Las filas inferiores (D-G), representan los niveles de citocinas encontradas solo en las placentas de las hembras. A) cuantificación de los niveles de IL-5 B) cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$  C) cuantificación de los niveles de IL-6 D) cuantificación de los niveles de IFN- $\gamma$  E) cuantificación de los niveles de IL-2 F) cuantificación de los niveles de IL-4 G) cuantificación de los niveles de IL-10

La tabla VII muestra la analítica de suero materno. Las columnas de la izquierda representan los valores del suero materno de la intervención aguda mientras los valores de las dos columnas de la derecha representan la intervención prolongada (10 semanas antes del apareamiento). Las muestras se procesaron en singular debido a que del suero materno también se analizarían las citoquinas. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas. En el caso de la glicemia las madres expuestas a HFD aguda no hubo diferencias significativas ( $277.0 \pm 99.00$  N=2 vs  $306.5 \pm 96.50$  N=2). Siguiendo con la intervención corta, los triacilglicéridos tuvieron valores de  $41.30 \pm 5.668$  N=2 en la situación control vs  $35.63 \pm 21.05$  N=2 en la situación experimental. El colesterol total tuvo valores de  $83.39 \pm 13.17$  N=2 vs  $89.00 \pm 11.00$  N=2 mientras los valores del colesterol HDL fueron de  $74.57 \pm 4.176$  N=2 vs  $80.50 \pm 10.50$  N=2. La insulina por su parte tuvo valores en el suero materno de  $3.805 \pm 1.285$  N=2 para las madres expuestas a NFD y de  $1.575 \pm 0.485$  N=2 para madres expuestas a HFD. En la exposición de 10 semanas antes del apareamiento no se pudo hacer un análisis estadístico porque la muestra por cada condición era igual a uno. Pero se observó en la situación control una glicemia igual a 56,52 y en la condición experimental 64,13. En cuanto a los triacilglicéridos se observó valores de 56,83 N=1 vs 64,48 N=1; colesterol total 50 N=1 vs 44 N=1, HDL 62,04 N=1 vs 70,39 N=1 y por último los valores de la insulina fueron de 1.205 N=1 para las madres expuestas a NFD y 1.095 N=1 para las expuestas a HFD.

**Tabla VIII.** Analítica de suero materno.

	Aguda		Prolongada	
	NFD	HFD	NFD	HFD
Glicemia (mg/dL)	277.0 ± 99.00 N=2	306.5 ± 96.50 N=2	56,52 N=1	64,13 N=1
TAG (mg/dL)	41.30 ± 5.668 N=2	35.63 ± 21.05 N=2	56,83 N=1	64,48 N=1
Colesterol (mg/dL)	83.39 ± 13.17 N=2	89.00 ± 11.00 N=2	50 N=1	44 N=1
HDL mg(dL)	74.57 ± 4.176 N=2	80.50 ± 10.50 N=2	62,04 N=1	70,39 N=1
Insulina (ng/mL)	3.805 ± 1.285 N=2	1.575 ± 0.485 N=2	1.205 N=1	1.095 N=1

Nota. Las columnas de la izquierda representan los valores del suero materno de la intervención aguda mientras los valores de las dos columnas de la derecha representan la intervención prolongada (10 semanas antes del apareamiento)

## Discusión

### La dieta materna alta en grasa altera la neurogénesis de la descendencia

En el desarrollo de la corteza, la neurogénesis requiere de la sobrevivencia, la renovación y la diferenciación de los progenitores apicales y la generación de los intermediarios que amplifican la generación de neuronas. Considerando esto, se discutirá el proceso de neurogénesis iniciando la generación de neuronas excitatorias que surgen de los AP, distinguiendo por separado hembras y machos y analizando los tres modelos por separado. Comenzaremos por el modelo de dieta alta en grasa materna por un periodo agudo, que empieza la exposición a la HFD en el día del apareamiento y concluye en el E13 o E15. Al realizar tinciones de inmunohistoquímica y cuantificarlas se analiza un punto en el tiempo de desarrollo de la corteza cerebral, por lo que se observa como resultado de fenómenos que transcurrieron tiempo atrás. Los resultados encontrados en este momento se reflejan de diferentes formas en análisis posteriores.

En machos de madres expuestas a una HFD, en el E13, la tendencia aumenta, aunque no significativamente, de los AP machos, y la reducción de progenitores intermediarios y de neuronas recién generadas marcadas con TBR1. A esta edad, existen dos posibilidades en cuanto a la disminución de IP: se están diferenciando aceleradamente en neuronas o no se generan suficientes a partir de los AP. Que encontremos NN reducido y que no exista diferencias significativas en los doble positivos TBR2/TBR1 nos hace pensar en la segunda posibilidad: de alguna manera la mHFD privilegia las divisiones de auto amplificación y no las divisiones celulares que generan IP. Para corroborar esto, se analizó el ángulo de división de los AP, puesto a que está relacionado con el destino de las células hijas: si se realizará una división asimétrica o simétrica, resultado en esta última dos AP como resultado de la división. Como resultado se obtuvo que la mHFD altera el ángulo de división en la descendencia de machos resultando en un mayor número de divisiones de auto amplificación. Durante la división celular de los progenitores apicales, la orientación del ángulo de división determina la distribución de los componentes celulares de la célula madre hacia las células hijas de una manera asimétrica o simétrica controlando el futuro de las células hijas (Chenn & McConnell, 1995; Fietz & Huttner, 2011; LaMonica et al., 2013; Lancaster & Knoblich, 2012). En la fase de expansión temprana, el husillo se orienta horizontalmente con precisión en relación con la superficie apical, dando lugar a un plano de escisión vertical. Durante la fase neurogénica, aumenta la fracción de AP con huso orientado oblicuamente/verticalmente (LaMonica et al., 2013; Rakic et al., 2009). Dicho esto, queda claro que el ángulo de división de los AP es importante pues decide el futuro de las células hijas: división simétrica (auto amplificación) o asimétrica (generando un IP). Por tanto, los resultados en el E13 sugieren que la disminución de NN es debido al bajo pool de IP que debe su número reducido al cambio en el ángulo de división de los AP.

Por otra parte, en el E15, en los machos de madres alimentadas con HFD, no se observó diferencias significativas en los AP, y se mantuvo la reducción en el número tanto de los IP como de las NN. Es en este día, se realizó un estudio de la morfología cerebral corroborándose que en los machos expuestos a una mHFD el tamaño cerebral, así como el ancho de la corteza cerebral y el plato cortical se encontró disminuido. Esto se correlaciona con los resultados en cuanto a la cuantificación de las poblaciones celulares estudiadas donde en

dos de ellas hubo una disminución (TBR2 y TBR1). Hasta este punto, nos inclinamos a pensar que la neurogénesis se encuentra deprimida y nos preguntamos sobre los efectos en la etapa posnatal que pudiera tener esto. Como resultado, se encontró que las neuronas excitatorias marcadas con SATB2 distribuidas a lo ancho de la corteza cerebral disminuyeron, pero no así con TBR1 en la corteza cerebral. Esto nos llama la atención, puesto a que esta población de TBR1 fue estudiada en la etapa embrionaria constatándose una disminución. Por tanto, que se normalizara el número de TBR1, indicaría que las NN generadas desde el E15 al final de la generación de neuronas TBR1, ocurrieron algún tipo de corrección, común en la dinámica de la neurogénesis. Además, hay que considerar que la HFD se discontinuó en el E15, lo que podría explicar el fenómeno. Si seguimos en esta línea, nos preguntamos si es que existió algún proceso de compensación con los TBR1, por qué no ocurrió, con las neuronas que expresan SATB2. En un estudio donde se indujo estrés prenatal a las madres embarazadas, ratonas, encontró una reducción de TBR2 en la etapa prenatal junto con una disminución de las NN, que expresan TBR1 (Z. Zhang et al., 2021). Aunque el número de neuronas positivas para SATB2 y TBR1 en el P0 se redujo, en el P14 no se encontraron afectadas, dando cuenta de que la neurogénesis es un proceso complejo y dinámico que puede corregir ciertas distorsiones en el tiempo.

Al P14, las neuronas que expresan SATB2, constituyen la inmensa mayoría de las neuronas excitatorias de la corteza cerebral, que engloba a un subgrupo de neuronas TBR1, corroborado por la existencia de dobles positivos TBR1/SATB2. En lo que respecta, coincidimos que el insulto ambiental estuvo presente el tiempo suficiente para no permitir una compensación posterior de un grupo tan elevado considerando que ya había ocurrido el pico en la generación de nuevas neuronas al E15, donde se retiró el insulto. Además, es posible que los efectos de la lipotoxicidad se mantuvieran durante un breve período de tiempo, provocando que la gran masa de neuronas generadas diferentes a TBR1, se viera poco afectada al término del insulto y por tanto los efectos fueron capaces de mantenerse en el tiempo con una reducción del número de estas células al P14. Como consecuencia, el ancho de la corteza cerebral se vio reducida en el P14 corroborando este resultado.

Además de esto, al explorar la migración celular, nos damos cuenta de que, la mHFD alteró la migración celular de los machos, dado por un aumento significativo en el número de células presentes en las capas superiores en detrimento de las capas inferiores. En los datos observados en la figura 8G-H, se observa cómo hay una tendencia a disminuir en las capas inferiores, pero no es significativa. Esto se debe a que la disminución se encuentra repartida entre todos los bins observados. Pero si agrupamos estos nos da una disminución significativa. Como es el caso de los TBR1 que se encuentra en la figura 8 F y que corresponde a los bins 8, 9 y 10.

En el modelo de mHFD corto, en el caso de las hembras expuestas a una mHFD, en el E13, observamos que la población de IP se mantuvo disminuida significativamente comparado con las hembras controles. Sin embargo, no hubo diferencias significativas, en ninguna de las poblaciones restantes estudiantes (PAX6 y TBR1). En contraste con los machos, donde la población de NN se encontró reducida. Si miramos los dobles positivos TBR2/TBR1, observamos que, en las hembras, pero no en los machos encontramos un aumento de estas células.

Por tanto, la razón por la que no tenemos NN disminuido a pesar de que los IP se encuentran reducidos, se deba probablemente, a que aumentó la diferenciación de los TBR2 a TBR1. En otras circunstancias, si esto ocurriera tendríamos un aumento de la población de NN, sin embargo, aquí no obtuvimos diferencias significativas, probablemente por la reducción en el número de TBR2, previamente. Otro de los puntos a notar es que el tamaño del efecto en cuanto a la disminución de los TBR2+ es mayor en las hembras que en los machos. Esto se debe probablemente a la sumatoria de dos fenómenos: el aumento de la transición de TBR2 a TBR1 y el estancamiento en la transición de PAX6 a TBR2. En relación con el ángulo de división no se vio afectado, en contraste con los machos, lo que podría explicar en parte el escaso efecto de la mHFD en la población de PAX6 ( $h = -0,12$ ). Más adelante en el E15, observamos que se mantiene la reducción en el número de TBR2, y llegados a este punto observamos una reducción en el número de NN al igual que en los machos. Por otra parte, a diferencia de estos, no observamos cambio en la proliferación de los progenitores, marcados con PHH3, que sí se observó en los machos. Esto da muestra de que existen variaciones en el fenómeno en cuanto al sexo. La disminución de la proliferación en la descendencia de madres expuestas a HFD, se ha reportado en la literatura (Stachowiak et al., 2013), sin embargo, en este estudio no se distinguió el sexo de la descendencia.

Analizando la morfología cerebral, tenemos una disminución, al igual que en los machos de la corteza cerebral (dorsal, dorsolateral y lateral), así como del plato cortical. Llama la atención, que no se observó una disminución del tamaño cerebral, medido con la longitud horizontal, que sí se vio afectado en los machos expuestos a mHFD. La explicación más probable, teniendo en cuenta que tanto el peso cerebral al E15 disminuyó en las hembras, y que tanto el ancho de la corteza como del plato cortical se redujo en las hembras expuestas a mHFD; se debe al plegamiento y o distorsión ocasionada en el momento de generar las crio secciones, pues pueden ocurrir modificaciones en el corte a la hora de ser adherido al portaobjeto, provocando que tanto la longitud horizontal como vertical se vean afectada. Sin embargo, esto no afecta digamos las demás longitudes calculadas, pues estas son más pequeñas y por tanto difícil de distorsionar en la manipulación manual. Tampoco esto afectaría el número de células.

En la etapa posnatal, en el P14, se observó el mismo fenómeno que en los machos, las hembras expuestas a una mHFD presentaron un menor ancho de la corteza cerebral, así como una reducción en el número de neuronas SATB2+. Así, a diferencia de los machos, las hembras expuestas a mHFD presentaron una reducción de TBR1 total. Dando otro punto sobre las diferencias en cuanto al sexo registrado en el fenómeno que ocurrió durante la neurogénesis. Por otro lado, analizando la distribución por capas se constató que al igual que en los machos, hubo un aumento significativo en las capas superiores a expensas de las inferiores de la corteza, lo que da cuenta de una alteración durante la migración celular.

Considerando que los resultados observados a P14 son los mismos entre machos y hembras, surge la idea de que las diferencias encontradas puedan deberse a un desfase propio del desarrollo de machos y hembras. Así, de manera combinada podemos explicar el déficit de células excitatorias presente en ambos sexos con la siguiente hipótesis: existe un arresto del ciclo celular de los AP, evidenciado por una disminución en la

proliferación de estas células, unido a un cambio del ángulo de división promoviendo la autogeneración de AP en etapas tempranas del desarrollo cerebral como E13 y por tanto disminuyendo la formación de IP. Como consecuencia tendríamos una generación de neuronas excitatorias disminuida, expresada como disminución en la generación de neuronas que se extiende a la etapa posnatal. Los IP, células TBR2+, son indispensables para la amplificación de la neurogénesis presente en los mamíferos (Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011).

Resultados similares encontramos en papers publicados que asocian inflamación materna con depresión de la neurogénesis cortical. Uno de estos estudios, analizó la proliferación de los progenitores neuronales de los embriones expuestos a una inflamación materna mediada por LPS (Stolp et al., 2011). Encontraron varias cosas: En el día 13.5 del embarazo, luego de 8 horas de la exposición a LPS, encontraron que la proliferación medida por la cuantificación de células PHH3 se encontró reducida, así como el ángulo de división de estas células se modificó dando lugar a un mayor número de divisiones asimétricas. Sin embargo, este estudio no analizó la población de AP e IP en el E13.5, pero si en el E15.5 donde no se encontraron diferencias significativas. Además, las células marcadas con PHH3 no se vieron afectadas en el E15.5. Sin embargo, se atribuye la pérdida del efecto a los procesos de compensación del proceso de neurogénesis. Otro de los hallazgos fue que en el P8 las capas V y VI que corresponden a las neuronas generadas entre el E13 y E15, encontraron un aumento del número de células y defectos en la migración lo que asociaron con el acortamiento de las proyecciones radiales de los progenitores, mostrado por la inmunorreactividad alterada de la tubulina acetilada, lo que sugirió que un déficit migratorio puede acompañar a la reducción de la proliferación después de la intervención. Al igual que en nuestro modelo, que encontramos un defecto en la migración caracterizado por un aumento de células en las capas superficiales en detrimento de las capas más profundas de la corteza, posiblemente producto del mismo fenómeno.

Además, se ha estudiado los efectos de ciertas citocinas en la neurogénesis, incluso la neurogénesis posnatal que ocurre en el hipocampo donde se administraron 10 ng/g de IL-1 $\beta$  dos veces al día a ratones Swiss Webster durante los primeros 5 días de vida, lo que aumentó los niveles hipocámpales de IL-1 $\alpha$  y redujo agudamente la proliferación de progenitores neurales Tbr2+ en el DG. In vitro, tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  produjeron la detención del ciclo celular G1/S que resultó en una reducción de la proliferación de células progenitoras dentro de la cohorte de células progenitoras amplificadoras de tránsito. Por otra parte, la supresión de la producción de IL-6 inhibe la neurogénesis de la SVZ de la corteza cerebral de ratones adultos (Jia et al., 2020). Aunque este mecanismo se describió en ratones adultos, los mecanismos de la neurogénesis en adultos son similares a la neurogénesis embrionaria. Nuestros datos sugieren una disminución de la neurogénesis y de la producción de IL-6 en las placentas de la descendencia masculina.

También se ha descrito como la mHFD induce un cambio en el microbiota intestinal impactando negativamente el comportamiento de la descendencia (Buffington et al., 2016; Gesù et al., 2021). Además, la microbiota intestinal materna impacta el desarrollo del cerebro fetal en ratones (Basak et al., 2022) afectando la axogénesis

talamocortical en el E14.5. Sugiriendo que mHFD al alterar la microbiota de la madre pudiera provocar inflamación materna lo que causa alteraciones de la neurogénesis cortical de la descendencia.

### **Interneuronas**

Las interneuronas son células inhibitoras que utilizan principalmente el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA). La mayoría de las interneuronas neocorticales, incluyendo los 2 subgrupos principales no superpuestos definidos por su expresión de parvalbúmina (PV) o somatostatina (SST), se originan en la eminencia ganglionar medial (MGE) (Wonders & Anderson, 2006). Se ha observado una disfunción de las interneuronas liberadoras de ácido  $\gamma$ -aminobutírico en muchos modelos animales de TEA (Chao et al., 2010; Q. Chen et al., 2020; Gogolla et al., 2014; Gonçalves et al., 2013) y trastorno de déficit de atención. (Nagamitsu et al., 2015). Incluso en un estudio que utilizó cerebros humanos se encontró un número reducido de interneuronas PV (Hashemi et al., 2017). También se ha asociado la reducción de la población de PV y SST con enfermedades como la esquizofrenia. (Dong et al., 2022; Van Derveer et al., 2020).

Analizando las interneuronas presentes en la corteza cerebral en el P14, se observó que las interneuronas que expresan somatostatina tanto en machos como en hembras expuestos a mHFD disminuyeron mientras que las que expresan parvalbúmina aumentaron. Como se menciona anteriormente las interneuronas tienen su origen en la MGE (Inan et al., 2012), por tal motivo se analizó la población celular que se encontraba proliferando y por tanto se marcaron con PHH3 en el E13 y en el E15. Esto reveló que mientras en el E13 había una disminución de estas células en la MGE de ambos sexos expuestos a una mHFD; en el E15 se encontró el efecto contrario, un aumento en las células que estaban proliferando. Esto se correlaciona con los efectos posnatales encontrados en las dos poblaciones de interneuronas estudiadas.

No existe, hasta la fecha, algún estudio que explore las interneuronas luego de una mHFD comenzando luego del apareamiento. Sin embargo, podemos hacer algunas inferencias. Sabemos que, cuando se altera el microbiota intestinal de una mujer embarazada, el desarrollo del sistema inmunitario de la descendencia se ve comprometido (Pronovost & Hsiao, 2019). Además, sabemos que la HFD es capaz de alterar el microbiota intestinal (Daniel et al., 2014). En la misma línea, las interacciones entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso durante la gestación y el período neonatal son importantes para guiar el neurodesarrollo normal. El neurodesarrollo implica una serie de eventos orquestados con precisión que ocurren desde la gestación hasta el período postnatal. Si bien no hay antecedentes de estudios previos utilizando la mHFD y las interneuronas, sí existe estudios previos donde estudia la generación de interneuronas en un ambiente inflamatorio materno. Un estudio mostró que la inflamación materna afecta a múltiples pasos del desarrollo de las interneuronas GABAérgicas corticales, es decir, la proliferación de células precursoras, migración y el posicionamiento de los neuroblastos, así como maduración neuronal (Vasistha et al., 2020). Entre sus hallazgos, en la corteza somatosensorial, se observó una disminución de las interneuronas PV+ y SST+. Nuestros datos sugieren una disminución de SST+, pero no de las PV+ donde estas aumentaron en la descendencia de madres expuestas a HFD. No es la primera vez que se reporta una disminución en las SST y un aumento en las PV (Hu et al., 2017),

demostrando que la generación de estas interneuronas es un proceso dinámico sensible. Además, si disminuyen las interneuronas SST+ pudiera provocar un incremento en la población de progenitores de interneuronas transitoriamente, lo que se traduciría en un aumento de la sinterneuronas PV+ las cuales se generan más tardíamente.

### **Los efectos sobre la neurogénesis de una mHFD difieren en cuanto al tiempo de exposición.**

Nos preguntamos si los efectos sobre el desarrollo de la corteza cerebral serían diferentes si la exposición a la mHFD fuera prolongada antes del apareamiento. Por lo que, analizamos la neurogénesis en el E15 de la descendencia de madres expuestas a HFD 4 semanas antes del apareamiento y 10 semanas antes.

En el caso de los machos de madres expuestas a HFD 4 semanas antes del apareamiento se observó que, si bien la población de TBR2 no se afectó, los AP se encontraron disminuidos en aquellos machos expuestos a mHFD, mientras que la proliferación disminuyó y el número de NN aumentó en los machos expuestos a mHFD. El fenómeno que se observó es muy diferente al observado en la intervención de 15 días, donde se encontró que las NN disminuyeron. Esto puede deberse a dos posibilidades: un aumento de la neurogénesis directa, a través de la diferenciación de los PAX6 directamente en TBR1, o un aumento de la diferenciación de los TBR2 a TBR1. Pero en este último caso lo más probable sería que la población de TBR2 estuviera disminuida, que no es el caso y los AP estaría sin diferencias significativa. Por otra parte, se tiene la siguiente hipótesis: existe un aumento de la neurogénesis directa pasando de AP a NN. Esto supondría una disminución de la población de AP y un aumento de las NN. Se puede pensar que debido a que los progenitores intermediarios provienen de los AP, y hay un aumento de la neurogénesis directa esta población, los IP tiende a disminuir. Sin embargo, no tenemos una disminución en el número de IP. Esto puede ser si la hipótesis fuera cierta, a que hay una masa de AP que sigue diferenciándose a IP, manteniendo el número de IP, mientras que otra masa de AP, que en la condición experimental sería mayor que en la normal, que se diferencia a neuronas directamente provocando un aumento de la neurogénesis directa. Nuestros datos sugieren que es así, ya que en los machos tenemos que los doble positivos PAX6/TBR2 no hay diferencias significativas, lo que sugiere que el recambio de la población de IP se lleva normalmente. De esto se obtendría estos resultados: los AP disminuidos, pues se diferencian a neuronas; los IP sin diferencias significativas o disminuidos, todo dependerá de si la población restante de AP que generan IP es la suficiente para mantener la tasa de recambio de los IP (esto se mira en los doble positivos PAX6/TBR2, sí); y NN aumentado: por un aumento de la neurogénesis directa sumado a la neurogénesis indirecta que sigue ocurriendo a un ritmo normal.

En cambio, si asumiéramos que la primera hipótesis planteada fuera verdadera: el proceso corriente que ocurre en la neurogénesis (PAX6->TBR2->TBR1) está acelerado, veríamos los mismos números que vemos en nuestros resultados: la población inicial (PAX6) se encuentra disminuida, mientras la población de TBR2 se encontraría disminuida o normal y TBR1 se encontraría aumentada. Pero, que no se observara un aumento de doble positivos PAX6/TBR2, haría improbable esta hipótesis. Para descartar y aceptar una de las dos, sería conveniente utilizar un anticuerpo contra SOX2 y NEUROD6: los doble positivos SOX2/TBR2: es un clúster

de aquellos IP que son inmaduros y que son más parecidos a los AP; mientras que los NEUROD6/TBR2 constituye la población celular que es más parecido a neuronas (neuron-like (N1–N3 nIPC) clusters) (Pebworth et al., 2021). Siguiendo la misma línea, el análisis morfológico corroboró la cuantificación celular de las principales poblaciones, no únicas, en esta etapa. Por una parte, tenemos el aumento del ancho del plato cortical, lo que corrobora que existan en esta etapa, E15, un aumento del NN. Destacable que no existieran diferencias en el tamaño cerebral, medida por la longitud horizontal, ni en el ancho de la corteza dorsal o dorsolateral, pero sí en la lateral. Esto se explica debido a la alteración observada en las poblaciones celulares de interés. Por una parte, hay una disminución de los AP, sumado a un aumento de los NN y las no diferencias observadas en los IP, hace que se cancelen mutuamente, pues no diferencias significativas. Sin embargo, llama la atención que en el caso de la corteza lateral si hubo diferencias significativas. En la corteza lateral, la mayoría de las células son PAX6+, por lo que la disminución de esta población disminuiría drásticamente el ancho de la zona ya que el incremento de NN compensa la pérdida en proporción de los AP.

En el caso de las hembras, tenemos que, si bien la población de AP y las células marcadas con PHH3 se encontraron disminuida, también se encontró disminuida la población TBR2+. Los doble positivos PAX6/TBR2, en el caso de las hembras expuestas a mHFD, se encontraron disminuidos, sugiriendo que la disminución de los IP se debió a una disminución en la transición de PAX6 a TBR2. Ahora bien, con estas condiciones diferentes a las encontradas en machos, donde encontramos una disminución de la población TBR2+ en hembras y, en el caso de las NN, no encontramos diferencias significativas como en machos, cabe preguntarse si el fenómeno observado es diferente. Sin embargo, pudiéramos estar observando el mismo fenómeno, pero en tiempos diferentes. Digamos, en el caso de los machos expuestos a mHFD teníamos NN aumentadas, pero estas NN son el resultado de dos fenómenos: neurogénesis directa e indirecta, por tanto, también hay contribución de los IP a las NN generadas en los machos. Es esperable que, si en machos aumentamos la neurogénesis directa y si la indirecta se mantuviera a una velocidad normal, como resultado obtendríamos un aumento de los NN. Pero en hembras tenemos los dos efectos, y si suponemos que la neurogénesis está alterada de igual forma a machos obtuviéramos los mismos resultados: NN se encontraría aumentado. En las hembras tenemos NN sin cambios porque en estas los IP están disminuidos, los cuales continúan convirtiéndose a un ritmo normal en neuronas, provocando una disminución de las NN generadas por neurogénesis directa, pero como tenemos un aumento de la neurogénesis directa, ambos efectos se suman y neutralizan generando una población de NN sin cambios. Ahora bien, ¿a qué se debe que la población de IP se encuentre disminuida solo en las hembras? Si tomamos como base un aumento de la neurogénesis directa, como es la conclusión que sacamos de los machos, es de esperar que la población de IP pudiera encontrarse disminuida o sin diferencias, todo depende del porcentaje de AP comprometida a IP. En machos este porcentaje fue suficiente para permitir la renovación de los IP, en cambio en hembras este porcentaje parece haber disminuido y un menor número de AP se comprometen a generar IP. Si comparamos la población de AP, comparando las hembras con los machos, la disminución fue menor en las hembras que en los machos, sugiriendo de que existe un porcentaje de AP que no está comprometida ni con la neurogénesis directa ni con la indirecta, sino que probablemente se esté auto amplificando, generando un desfase con respecto a los machos,

probablemente, en las horas siguientes, la transición de PAX6 a TBR2 aumente normalizando la población de TBR2 y aumentando la neurogénesis indirecta, lo que provocaría un aumento de las NN al igual que en los machos. Lo que sería este desfase hipotético, se observó en el caso del modelo corto (15 días de mHFD) donde en el día E13 solo los machos tenían una disminución de los TBR1, pero en el día E15 ambos sexos tenían la disminución de NN. Para comprobarlo, sería conveniente mirar lo que ocurre en días posteriores dígame en el E17. Seguidamente analizando los datos de morfología de la corteza cerebral, en las hebras expuestas a mHFD, observamos que el ancho del plato cortical no se observaron diferencias, lo que corrobora la no diferencia obtenida en la cuantificación de los TBR1, además observamos que, en el caso de la longitud de la corteza lateral, tampoco se obtuvo diferencia significativa alguna. Esto corrobora el hecho planteado de que en el caso de las hebras exista una población de PAX6, que o se está auto amplificando o se encuentra estancada en algún punto del ciclo celular.

Ahora bien, en nuestro modelo más largo de mHFD, que comenzó 10 semanas antes del apareamiento, si bien obtuvimos resultados similares a el modelo de 4 semanas de mHFD anteriores. Hay diferencias notablemente diferentes: en ambos sexos hubo un aumento de NN a expensas de una disminución de los AP, sin diferencias significativas en los IP. A diferencia del modelo expuesto anteriormente, en este caso los dobles positivos PAX6/TBR2 se encontraron aumentados, y a pesar de que las células marcadas con PHH3 no hubo diferencias significativas, al normalizarlas por la población de PAX6 se encontró aumentada. El aumento de las NN nos sugiere un aumento de la neurogénesis y como en el caso anterior nos sugiere una de tres: existe un aumento de la neurogénesis directa, de la indirecta o de ambas. El aumento de los dobles positivos PAX6/TBR2 en ambos sexos expuestos a mHFD, sugiere que existe un aumento del paso de los PAX6 a TBR2, como resultado a esto obtendríamos que la población de TBR2 se encontraría aumentada, pero no es el caso, sugiriendo que por ende la población de TBR2 está, de alguna forma, generando rápidamente NN. Esto sumado al aumento de la proliferación cuando miramos los valores de células marcadas con PHH3 normalizadas por PAX6, nos sugiere que la neurogénesis indirecta se encuentra aumentada. Aunque esto no descarta, que la directa también esté aumentada. Cuando analizamos macroscópicamente el cerebro, nos damos cuenta de que, en el E15, el peso cerebral se encontró aumentado significativamente en la descendencia de madres expuestas a mHFD. Pero al escindirlo por sexo, solo en las hembras este aumento es significativo. Aunque en los machos expuestos a mHFD, hubo una tendencia al aumento del peso, sin embargo, como se puede observar en la imagen, hubo un cerebro con un peso muy por debajo del resto. Lo que indica que, si eliminamos esto habría diferencias significativas, pero no es posible determinar si esto ocurrió por un problema en la medición o si fue por un efecto selectivo sobre el embrión de la camada en cuestión. Tendríamos, que repetir el experimento, aumentar el N para poder observar con claridad si este aumento es solo en las hembras, debido a que microscópicamente vemos el mismo efecto en la corteza en ambos sexos. Este cerebro con un peso muy inferior en los machos pudo haber sido un outlier, pero eliminarlo del análisis significaría disminuir el N que teníamos previsto.

En contraste con nuestros datos, un estudio encontró que tras 10 semanas de mHFD, la proliferación, medida por el número de células positivas a PHH3, se encontró aumentada (Niculescu & Lupu, 2009). Nuestros datos

indican una disminución de las células PHH3+. Sin embargo, este estudio utilizó otro modelo de mHFD, donde el 60% de la energía provenía de las grasas, además los análisis se realizaron en el E17 y no en el E15 que utilizamos nosotros y no hicieron diferencias en cuanto al sexo, por lo que los resultados pudieran ser diferentes dadas estas razones.

### **La mHFD altera el estado inflamatorio de la placenta**

El análisis metabólico de la madre no arrojó resultados significativos. Los ratones estuvieron con comida ad libitum, por lo que no estaban en ayuno al momento de la extracción de la sangre, ya que esta extracción se produjo cuando obtuvo los cerebros para procesar y se requirió la muerte del animal, para obtener un volumen de sangre suficiente para correr los experimentos. Además, también se analizó el suero materno pero la escasa muestra hizo imposible realizar un análisis estadístico apropiado por lo que este ensayo configura un estudio piloto para ser ampliado. Sin embargo, si se pudo realizar el análisis de citoquinas de la placenta. Algunos estudios anteriores han demostrado una producción desequilibrada de citocinas inflamatorias versus antiinflamatorias en el tejido placentario durante la preeclampsia y una mayor producción de citocinas inflamatorias en el plasma placentario (Keelan & Mitchell, 2007). Por ejemplo, se han informado niveles elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 en casos de preeclampsia en comparación con la condición de control (Aggarwal et al., 2019). Un estudio reciente (Zhou et al., 2023) ha demostrado que el aumento de la expresión de IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  placentarios se asocia con el desarrollo intelectual de la descendencia. Específicamente, la IL-6 se asoció negativamente con la memoria infantil en los niños y el índice de comprensión en las niñas, mientras que el TNF- $\alpha$  se asoció negativamente con el índice de comprensión en las niñas. Destacando así el efecto específico del sexo de algunas citoquinas durante el desarrollo. Se ha demostrado que una dieta rica en grasas puede inducir cambios morfológicos en la placenta. En concreto, aumenta el grosor de la zona del laberinto en la placenta (Bondarczuk et al., 2023). Parámetro que fue asociado por los autores con una alteración del transporte entre madre y feto. Además, los modelos de roedores con consumo de una dieta materna rica en grasas han informado una masa placentaria reducida (Taylor et al., 2003), mientras que en los modelos ovinos la disminución de la masa placentaria estuvo acompañada de un flujo sanguíneo reducido (Wallace et al., 2008). Lo que sugiere que una dieta rica en grasas conduce a una disfunción placentaria.

Los resultados obtenidos en la placenta sugieren que la dieta materna alta en grasa induce un estado inflamatorio diferencial según el sexo de la descendencia. En las hembras, se encontró un aumento de TNF- $\alpha$ , una citocina proinflamatoria que puede afectar la morfogénesis y la migración neuronal. En los machos, se observó una disminución de IL-6, una citocina que tiene efectos neurotróficos y neuro protector. Estos cambios pueden estar relacionados con las alteraciones observadas en el desarrollo cortical, donde las hembras mostraron una reducción de los progenitores intermedios y los machos un aumento de las neuronas. Estos hallazgos apuntan a una posible vulnerabilidad de las hembras al estrés metabólico prenatal, que podría tener consecuencias a largo plazo en el funcionamiento cognitivo y emocional. En el modelo de mHFD usado en primates no humanos encontraron de que precisamente las hembras mostraban un comportamiento relacionado a la ansiedad no visto en la descendencia masculina.

### **La dieta materna alta en grasa tiene un efecto diferencial en cuanto al sexo de la descendencia**

Los trastornos del neurodesarrollo son un grupo de condiciones que aparecen temprano en el desarrollo y se caracterizan por alteraciones en el funcionamiento personal, social y ocupacional. Notablemente, la prevalencia de los trastornos del neurodesarrollo está aumentando. Comprender los sesgos de sexo en estos trastornos puede arrojar luz sobre los mecanismos de riesgo y resiliencia, así como avanzar en la comprensión que tenemos del cerebro y el comportamiento humano. Los dos trastornos del neurodesarrollo más comunes, el TEA y el TDAH, exhiben sesgos de prevalencia masculina y diferencias de sexo en la sintomatología (Maenner et al., 2023). Muchas líneas de investigación activas están explorando posibles mecanismos, incluyendo factores genéticos y hormonales, y su interacción con variables ambientales. En el caso de estudios del comportamiento en animales de la descendencia de madres expuestas a HFD se han obtenido diferencias entre ambos sexos,

Al analizar las poblaciones celulares estudiadas observamos que en ocasiones solo se afectan los machos y viceversa. Esto solo ocurrió en casos aislados: Digamos, en la intervención corta de la dieta alta en grasa (15 días), en el E13 se observa que las NN se reducen en machos, pero no en hembras, donde no hubo diferencias significativas, incluso en este caso la media estuvo algo elevada en la situación experimental con respecto al control. Sin embargo, si miramos 2 días más tarde, al E15, notamos de que tanto en hembras como machos se encuentra disminuido la población de NN, corrigiéndose la distorsión en cuanto a la diferencia del efecto encontrado. Si nos centramos en los modelos de exposición más largo (4 semanas) observamos la población de progenitores intermediarios mientras en los machos no existen diferencias significativas, en las hembras ocurre una disminución de esta población en la situación experimental con respecto al control. A pesar de esto, las NN generadas sólo los machos se afectaron con un aumento de esta población (ver Figura 10 H) en la descendencia de madres expuestas a una dieta alta en grasa, mientras que en las hembras no hubo diferencias significativas. Morfológicamente observamos que los resultados se asocian, pues en el plato cortical (Figura 11 H) que refleja la población de neuronas presentes en la corteza encontramos un aumento en los machos, pero no en las hembras de madres expuestas a una HFD.

Por otra parte, si analizamos el tamaño del efecto vemos que el tamaño del efecto es diferente en las poblaciones celulares y el sexo de la descendencia expuesta a una dieta materna alta en grasa tanto en la intervención corta como en la intervención prolongada vemos lo siguiente. Los progenitores apicales, marcados con PAX6 se ven afectados en los machos si medimos el tamaño de efecto (Ver Tabla I, II, III) con relación a las hembras. Sin embargo, en cuanto a los progenitores intermediarios, vemos que el efecto es mayor en las hembras que en los machos y si hablamos de las neuronas recién generadas en el período embrionario; notamos que el efecto es mayor en machos que en hembras (Ver Tablas I-III). Llegados a este punto podemos deducir del trabajo concluido que existen un efecto diferencial en cuanto al sexo de una dieta materna alta en grasa sobre el desarrollo de la corteza cerebral y el sexo de la descendencia.

Las diferencias de sexo en el cerebro pueden ser influenciadas por factores genéticos, hormonales y ambientales que actúan de forma compleja e interactiva. Según un estudio publicado en la revista *Molecular Psychiatry* (Reinius & Jazin, 2009), las diferencias genéticas sexuales en el cerebro humano adulto ya están establecidas en el cerebro antes del nacimiento. El estudio muestra que varios genes codificados en el cromosoma Y se expresan en muchas regiones del cerebro prenatal masculino, probablemente teniendo consecuencias funcionales para el sesgo de sexo durante el desarrollo cerebral humano. El estudio también revela que la expresión de más de un tercio de los genes codificados en el cromosoma Y en el cerebro humano prenatal apunta a su importancia en el desarrollo cerebral distinguiéndose un sesgo de sexo. Un estudio (preprint) investiga las diferencias de sexo en el desarrollo prenatal de la complejidad neural en el cerebro humano, utilizando la magnetoencefalografía (MEG) para medir las respuestas corticales a irregularidades auditivas en fetos y recién nacidos (Frohlich et al., 2023). El estudio encontró que la complejidad neural disminuye más rápido en los fetos masculinos que en los femeninos para la mayoría de las medidas de entropía, lo que sugiere diferencias de sexo en la evolución de la dinámica cortical prenatal.

Los trastornos del espectro autista tienen una prevalencia mayor en el sexo masculino con una razón de casi 4:1 con respecto a las mujeres (Maenner et al., 2023). Esto ha llevado a especulaciones sobre si las diferencias biológicas entre hombres y mujeres son en parte responsables de este desequilibrio de género, con varios estudios que identifican una relación entre la diferenciación sexual del cerebro y el desarrollo del autismo. La testosterona fetal se encuentra correlacionada positivamente con el Q-CHAT (Auyeung et al., 2012), el cual está diseñado para identificar a los niños entre los 18 a 48 meses, en riesgo de tener una condición del espectro autista. Es interesante que un estudio (Villa et al., 2021) analizó las diferencias sexuales en el cerebro en desarrollo en fetos e infantes con baja o alta probabilidad de desarrollar autismo, encontrando que la diferenciación sexual del cerebro fetal, en cuanto a volumen cerebral total, era más pronunciada en los fetos con una alta probabilidad de autismo, teniendo el cerebro masculino mayor volumen total lo que sugiere que el desarrollo del autismo puede estar relacionado con el sexo. Por otra parte, un estudio utilizó un enfoque *ex vivo* para comprender las diferencias específicas de sexo en la señalización de andrógenos placentarios en presencia y ausencia de inflamación (Meakin et al., 2022). Los datos presentados en este estudio sugieren que el sexo placentario y la inflamación alteran el eje de señalización de andrógenos placentarios, mediante el cual los machos retienen o rescatan el crecimiento a través de la transcripción preferencial de factores angiogénicos y de crecimiento. Esta adaptación específica del sexo en presencia de inflamación parece estar impulsada por la localización nuclear de AR-45.

No es fácil concluir si algún sexo se afecta de manera más severa o no por la exposición a una dieta materna alta en grasa, ya que los efectos pueden variar según el tipo de célula, el momento del desarrollo y el trastorno del neurodesarrollo que se considere. Sin embargo, algunos estudios sugieren que los machos podrían ser más vulnerables al estrés nutricional prenatal, lo que podría explicar en parte la mayor prevalencia de TEA y TDAH en este sexo. Por ejemplo, un estudio reciente (Genc et al., 2018) encontró que los fetos masculinos expuestos a una dieta alta en grasas mostraban una menor conectividad funcional cerebral que los controles, mientras que

las hembras no mostraban diferencias significativas. Otro estudio (Cutting et al., 2020) halló que la exposición prenatal a una dieta alta en grasa alteraba la expresión génica de varias vías relacionadas con el desarrollo cerebral y el riesgo de trastornos del neurodesarrollo, y que estos cambios eran más pronunciados en los machos que en las hembras. Estos hallazgos sugieren que los machos podrían tener una menor capacidad de adaptarse a las condiciones adversas durante el desarrollo, lo que podría afectar negativamente a su desarrollo neuronal y cognitivo. Por tanto, se necesitan más investigaciones para comprender los mecanismos moleculares, celulares y funcionales que subyacen a las diferencias de sexo en la susceptibilidad a los trastornos del neurodesarrollo inducidos por el estrés nutricional prenatal.

Estos resultados son relevantes para la comprensión de los mecanismos involucrados en el desarrollo cortical y sus posibles alteraciones por factores ambientales, como la dieta materna. También podrían tener implicaciones clínicas, ya que los trastornos del neurodesarrollo, como el autismo o el TDAH, presentan diferencias de sexo tanto en la prevalencia como en la manifestación de los síntomas. Estos trastornos suelen diagnosticarse más tarde en las niñas que en los niños, lo que puede retrasar la intervención temprana y afectar al pronóstico. Por lo tanto, es importante investigar cómo la exposición prenatal a una dieta alta en grasa puede influir en el desarrollo cerebral según el sexo de la descendencia, y si existen marcadores biológicos o conductuales que puedan facilitar el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado.

## **Conclusión y proyecciones.**

La exposición a una dieta alta en grasa materna (mHFD) tiene efectos profundos y duraderos en la neurogénesis cortical, manifestándose desde etapas embrionarias tempranas hasta el periodo postnatal. Estos efectos varían según el tiempo de exposición y el sexo de la descendencia. La mHFD altera la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales, con un aumento de las divisiones simétricas de los progenitores apicales y una disminución en la generación de progenitores intermedios y neuronas recién generadas. Estos cambios se observan de manera diferenciada entre machos y hembras, lo que sugiere una susceptibilidad sexualmente dismórfica a los efectos de la dieta materna. En los machos, la mHFD provoca una disminución significativa de los progenitores apicales y de las neuronas recién generadas, mientras que en las hembras se observa una reducción de los progenitores intermedios. La investigación futura se orientará a sistematizar estos datos para su publicación y a utilizar estos resultados como base para simulaciones computacionales que puedan predecir los efectos a largo plazo de la mHFD en el desarrollo cortical. Estos hallazgos subrayan la importancia de una nutrición materna adecuada durante el embarazo para prevenir alteraciones en el desarrollo cerebral de la descendencia y abren nuevas vías para explorar intervenciones terapéuticas específicas basadas en el sexo.

## Bibliografía

- Aggarwal, R., Jain, A. K., Mittal, P., Kohli, M., Jawanjal, P., & Rath, G. (2019). Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *33*(4), e22834. <https://doi.org/10.1002/jcla.22834>
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(4), 287-293. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Arellano, J. I., Morozov, Y. M., Micali, N., & Rakic, P. (2021). Radial Glial Cells: New Views on Old Questions. *Neurochemical Research*, *46*(10), 2512-2524. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03296-z>
- Arnold, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., Bang, S., Choi, B.-R., Chen, Y., McMullen, M. F., & Kim, S. F. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease*, *67*, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.011>
- Auyeung, B., Ahluwalia, J., Thomson, L., Taylor, K., Hackett, G., O'Donnell, K. J., & Baron-Cohen, S. (2012). Prenatal versus postnatal sex steroid hormone effects on autistic traits in children at 18 to 24 months of age. *Molecular Autism*, *3*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-3-17>
- Avila, A., Nguyen, L., & Rigo, J.-M. (2013). Glycine receptors and brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 184. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00184>
- Avila, A., Vidal, P. M., Dear, T. N., Harvey, R. J., Rigo, J.-M., & Nguyen, L. (2013). Glycine Receptor  $\alpha 2$  Subunit Activation Promotes Cortical Interneuron Migration. *Cell Reports*, *4*(4), 738-750. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.016>
- Avila, A., Vidal, P. M., Tielens, S., Morelli, G., Laguesse, S., Harvey, R. J., Rigo, J.-M., & Nguyen, L. (2014). Glycine receptors control the generation of projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cell Death & Differentiation*, *21*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.75>
- Basak, S., Das, R. K., Banerjee, A., Paul, S., Pathak, S., & Duttaroy, A. K. (2022). Maternal Obesity and Gut Microbiota Are Associated with Fetal Brain Development. *Nutrients*, *14*(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/nu14214515>

- Belmonte-Mateos, C., & Pujades, C. (2022). From Cell States to Cell Fates: How Cell Proliferation and Neuronal Differentiation Are Coordinated During Embryonic Development. *Frontiers in Neuroscience, 15*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.781160>
- Ben-Hur, T., Ben-Menachem, O., Furer, V., Einstein, O., Mizrahi-Kol, R., & Grigoriadis, N. (2003). Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Molecular and Cellular Neurosciences, 24*(3), 623-631. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00218-5](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00218-5)
- Bondarczuk, N. H., Schmidt, N. P., Breyer, G. M., de Moura, A. C., Molz, P., Barshack, A. G., da Motta, A. de S., Guedes, R. P., & Giovenardi, M. (2023). A high-fat diet changes placental morphology but does not change biochemical parameters, placental oxidative stress or cytokine levels. *Placenta, 135*, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2023.02.004>
- Bortone, D., & Polleux, F. (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron, 62*(1), 53-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.034>
- Bray, G. A., & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity! *The American Journal of Clinical Nutrition, 68*(6), 1157-1173. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1157>
- Broadie, K., Baumgartner, S., & Prokop, A. (2011). Extracellular matrix and its receptors in Drosophila neural development. *Developmental neurobiology, 71*(11), 1102-1130. <https://doi.org/10.1002/dneu.20935>
- Buchsbaum, I. Y., & Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the CNS during development and disease: Insights from in vivo and in vitro models. *Development, 146*(1), dev163766. <https://doi.org/10.1242/dev.163766>
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell, 165*(7), 1762-1775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
- Chao, H.-T., Chen, H., Samaco, R. C., Xue, M., Chahrour, M., Yoo, J., Neul, J. L., Gong, S., Lu, H.-C., Heintz, N., Ekker, M., Rubenstein, J. L. R., Noebels, J. L., Rosenmund, C., & Zoghbi, H. Y. (2010).

- Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*, 468(7321), 263-269. <https://doi.org/10.1038/nature09582>
- Chen, C., Xu, X., & Yan, Y. (2018). Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. *PloS One*, 13(8), e0202183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202183>
- Chen, Q., Deister, C. A., Gao, X., Guo, B., Lynn-Jones, T., Chen, N., Wells, M. F., Liu, R., Goard, M. J., Dimidschstein, J., Feng, S., Shi, Y., Liao, W., Lu, Z., Fishell, G., Moore, C. I., & Feng, G. (2020). Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD. *Nature Neuroscience*, 23(4), 520-532. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0598-6>
- Chenn, A., & McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell*, 82(4), 631-641. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90035-7)
- Cooper, J. A. (2008). A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends in Neurosciences*, 31(3), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.003>
- Cortés-Albornoz, M. C., García-Guáqueta, D. P., Velez-van-Meerbeke, A., & Talero-Gutiérrez, C. (2021). Maternal Nutrition and Neurodevelopment: A Scoping Review. *Nutrients*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/nu13103530>
- Corvalán, C., Reyes, M., Garmendía, M. L., & Uauy, R. (2013). Structural responses to the obesity and non-communicable diseases epidemic: The Chilean Law of Food Labeling and Advertising. *Obesity Reviews*, 14(S2), 79-87. <https://doi.org/10.1111/obr.12099>
- Crespo, I., Pignatelli, J., Kinare, V., Méndez-Gómez, H. R., Esgleas, M., Román, M. J., Canals, J. M., Tole, S., & Vicario, C. (2022). Tbr1 Misexpression Alters Neuronal Development in the Cerebral Cortex. *Molecular Neurobiology*, 59(9), 5750-5765. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02936-x>
- Daniel, H., Gholami, A. M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., Böhm, C., Wenning, M., Wagner, M., Blaut, M., Schmitt-Kopplin, P., Kuster, B., Haller, D., & Clavel, T. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME Journal*, 8(2), 295-308. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.155>

- Dearden, L., Buller, S., Furigo, I. C., Fernandez-Twinn, D. S., & Ozanne, S. E. (2020). Maternal obesity causes fetal hypothalamic insulin resistance and disrupts development of hypothalamic feeding pathways. *Molecular Metabolism*, *42*, 101079. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101079>
- Dearden, L., & Ozanne, S. E. (2015). Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *39*, 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.08.001>
- Di Filippo, M., Sarchielli, P., Picconi, B., & Calabresi, P. (2008). Neuroinflammation and synaptic plasticity: Theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, *29*(8), 402-412. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.06.005>
- Dong, J., Chen, W., Liu, N., Chang, S., Zhu, W., & Kang, J. (2022). NRG1 knockdown rescues PV interneuron GABAergic maturation deficits and schizophrenia behaviors in fetal growth restriction mice. *Cell Death Discovery*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01271-3>
- Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., & Xu, K. (2018). Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2649. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02649>
- Dwyer, N. D., Chen, B., Chou, S.-J., Hippenmeyer, S., Nguyen, L., & Ghashghaei, H. T. (2016). Neural Stem Cells to Cerebral Cortex: Emerging Mechanisms Regulating Progenitor Behavior and Productivity. *Journal of Neuroscience*, *36*(45), 11394-11401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2359-16.2016>
- ENCUESTA DE CONSUMO ALIMENTARIO EN CHILE (ENCA). (s. f.). Ministerio de Salud – Gobierno de Chile. Recuperado 6 de febrero de 2024, de <https://www.minsal.cl/enca/>
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A. M., Bulfone, A., Kowalczyk, T., & Hevner, R. F. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. *The Journal of Neuroscience*, *25*(1), 247-251. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005>
- Faber, D. S., & Pereda, A. E. (2018). Two Forms of Electrical Transmission Between Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00427>

- Ferguson, B. R., & Gao, W.-J. (2018). PV Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*, 37. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>
- Fernández, V., Llinares-Benadero, C., & Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: What have we learned? *The EMBO Journal*, *35*(10), 1021-1044. <https://doi.org/10.15252/embj.201593701>
- Fietz, S. A., & Huttner, W. B. (2011). Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—A polarized perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, *21*(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.10.002>
- Finkelstein, E. A., Khavjou, O. A., Thompson, H., Trogdon, J. G., Pan, L., Sherry, B., & Dietz, W. (2012). Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *American Journal of Preventive Medicine*, *42*(6), 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.10.026>
- Flores Cruz, M. G., & Escobar, A. (2011). Normal neuronal migration. *Salud Mental*, *34*(1), 61-66.
- Flórez, C. E. H., García, G. A. C., & Avendaño, M. A. B. (2018). Desarrollo neuroembriológico: El camino desde la proliferación hasta la perfección. *Universitas Medica*, *59*(3), Article 3. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed59-3.dneu>
- Frohlich, J., Moser, J., Sippel, K., Mediano, P. A. M., Preissl, H., & Gharabaghi, A. (2023). *Sex differences in prenatal development of neural complexity in the human brain* (p. 2022.11.21.517302). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.11.21.517302>
- Fusco, S., Spinelli, M., Cocco, S., Ripoli, C., Mastrodonato, A., Natale, F., Rinaudo, M., Livrizzi, G., & Grassi, C. (2019). Maternal insulin resistance multigenerationally impairs synaptic plasticity and memory via gametic mechanisms. *Nature Communications*, *10*, 4799. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12793-3>
- Gesù, C. M. D., Matz, L. M., & Buffington, S. A. (2021). Diet-induced dysbiosis of the maternal gut microbiome in early life programming of neurodevelopmental disorders. *Neuroscience research*, *168*, 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.05.003>
- Glastras, S. J., Chen, H., Pollock, C. A., & Saad, S. (2018). Maternal obesity increases the risk of metabolic disease and impacts renal health in offspring. *Bioscience Reports*, *38*(2), BSR20180050. <https://doi.org/10.1042/BSR20180050>

- Gogolla, N., Takesian, A. E., Feng, G., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2014). Sensory integration in mouse insular cortex reflects GABA circuit maturation. *Neuron*, *83*(4), 894-905.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.033>
- Gohir, W., Kennedy, K. M., Wallace, J. G., Saoi, M., Bellissimo, C. J., Britz-McKibbin, P., Petrik, J. J., Surette, M. G., & Sloboda, D. M. (2019). High-fat diet intake modulates maternal intestinal adaptations to pregnancy and results in placental hypoxia, as well as altered fetal gut barrier proteins and immune markers. *The Journal of Physiology*, *597*(12), 3029-3051.  
<https://doi.org/10.1113/JP277353>
- Gonçalves, J. T., Anstey, J. E., Golshani, P., & Portera-Cailliau, C. (2013). Circuit level defects in the developing neocortex of Fragile X mice. *Nature Neuroscience*, *16*(7), 903-909.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3415>
- Gupta, M. K., De Jesus, D. F., Kahraman, S., Valdez, I. A., Shamsi, F., Yi, L., Swensen, A. C., Tseng, Y.-H., Qian, W.-J., & Kulkarni, R. N. (2018). Insulin receptor-mediated signaling regulates pluripotency markers and lineage differentiation. *Molecular Metabolism*, *18*, 153-163.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.09.003>
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. L., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, *464*(7288), 554-561.  
<https://doi.org/10.1038/nature08845>
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, *23*(2), 270-299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., & Martínez-Cerdeño, V. (2017). The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, *27*(3), 1931-1943. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw021>
- Hatanaka, Y., Wada, K., & Kabuta, T. (2016). Maternal high-fat diet leads to persistent synaptic instability in mouse offspring via oxidative stress during lactation. *Neurochemistry International*, *97*, 99-108.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.03.008>

- Heslehurst, N., Vieira, R., Akhter, Z., Bailey, H., Slack, E., Ngongalah, L., Pemu, A., & Rankin, J. (2019). The association between maternal body mass index and child obesity: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Medicine*, *16*(6), e1002817. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002817>
- Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *Journal of Anatomy*, *235*(3), 616-625. <https://doi.org/10.1111/joa.12939>
- Hu, J. S., Vogt, D., Lindtner, S., Sandberg, M., Silberberg, S. N., & Rubenstein, J. L. R. (2017). Coup-TF1 and Coup-TF2 control subtype and laminar identity of MGE-derived neocortical interneurons. *Development*, *144*(15), 2837-2851. <https://doi.org/10.1242/dev.150664>
- Inan, M., Welagen, J., & Anderson, S. A. (2012). Spatial and Temporal Bias in the Mitotic Origins of Somatostatin- and Parvalbumin-Expressing Interneuron Subgroups and the Chandelier Subtype in the Medial Ganglionic Eminence. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, *22*(4), 820-827. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr148>
- Jakovcevski, I., Andjus, P. R., & Förster, E. (2023). Editorial: Extracellular matrix in development and disorders of the nervous system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1153484. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1153484>
- Jia, C., Keasey, M. P., Malone, H. M., Lovins, C., & Hagg, T. (2020). Vitronectin mitigates stroke-increased neurogenesis only in female mice and through FAK-regulated IL-6. *Experimental neurology*, *323*, 113088. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113088>
- Jiménez-Chillarón, J. C., Díaz, R., Martínez, D., Pentinat, T., Ramón-Krauel, M., Ribó, S., & Plösch, T. (2012). The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*, *94*(11), 2242-2263. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.012>
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *7*(6), 476-486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>
- Keays, D. A. (2007). Neuronal migration: Unraveling the molecular pathway with humans, mice, and a fungus. *Mammalian Genome*, *18*(6), 425-430. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9034-4>
- Keelan, J. A., & Mitchell, M. D. (2007). Placental cytokines and preeclampsia. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *12*, 2706-2727. <https://doi.org/10.2741/2266>

- Kenny, P. J. (2011). Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 12(11), 638-651. <https://doi.org/10.1038/nrn3105>
- Khodosevich, K., & Monyer, H. (2011). Signaling in Migrating Neurons: From Molecules to Networks. *Frontiers in Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00028>
- Kirk, S. F. L., Penney, T. L., & McHugh, T.-L. F. (2010). Characterizing the obesogenic environment: The state of the evidence with directions for future research. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(2), 109-117. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00611.x>
- LaMonica, B. E., Lui, J. H., Hansen, D. V., & Kriegstein, A. R. (2013). Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nature Communications*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms2647>
- Lan, X., Chen, Q., Wang, Y., Jia, B., Sun, L., Zheng, J., & Peng, H. (2012). TNF- $\alpha$  Affects Human Cortical Neural Progenitor Cell Differentiation through the Autocrine Secretion of Leukemia Inhibitory Factor. *PLoS ONE*, 7(12), e50783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050783>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 737-746. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.003>
- Li, J., Sun, L., Peng, X.-L., Yu, X.-M., Qi, S.-J., Lu, Z. J., Han, J.-D. J., & Shen, Q. (2021). Integrative genomic analysis of early neurogenesis reveals a temporal genetic program for differentiation and specification of preplate and Cajal-Retzius neurons. *PLOS Genetics*, 17(3), e1009355. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009355>
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., & Marín, O. (2018). Development and functional diversification of cortical interneurons. *Neuron*, 100(2), 294-313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009>
- Lin, Y., Yang, J., Shen, Z., Ma, J., Simons, B. D., & Shi, S.-H. (2021). Behavior and lineage progression of neural progenitors in the mammalian cortex. *Current opinion in neurobiology*, 66, 144-157. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.10.017>
- Lübke, R., Eberhardt, J., Röhl, F.-W., Janitzky, K., Nullmeier, S., Stork, O., Schwegler, H., & Linke, R. (2015). Identification and Characterization of GABAergic Projection Neurons from Ventral Hippocampus to Amygdala. *Brain Sciences*, 5(3), 299-317. <https://doi.org/10.3390/brainsci5030299>

- Maenner, M. J., Warren, Z., Williams, A. R., Amoakohene, E., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Furnier, S. M., Hughes, M. M., Ladd-Acosta, C. M., McArthur, D., Pas, E. T., Salinas, A., Vehorn, A., Williams, S., Esler, A., Grzybowski, A., Hall-Lande, J., ... Shaw, K. A. (2023). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveillance Summaries*, 72(2), 1-14. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7202a1>
- Malatesta, P., Hartfuss, E., & Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development (Cambridge, England)*, 127(24), 5253-5263. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5253>
- Manousopoulou, A., Woo, J., Woelk, C. H., Johnston, H. E., Singhanian, A., Hawkes, C., Garbis, S. D., & Carare, R. O. (2015). Are you also what your mother eats? Distinct proteomic portrait as a result of maternal high-fat diet in the cerebral cortex of the adult mouse. *International Journal of Obesity (2005)*, 39(8), 1325-1328. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.35>
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(10), 793-807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Matsuzaki, F., & Shitamukai, A. (2015). Cell Division Modes and Cleavage Planes of Neural Progenitors during Mammalian Cortical Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a015719. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015719>
- Meakin, A. S., Gough, M., Saif, Z., & Clifton, V. L. (2022). An ex vivo approach to understanding sex-specific differences in placental androgen signalling in the presence and absence of inflammation. *Placenta*, 120, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.02.010>
- Ministerio de Salud. (2018). *Informe Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Estado Nutricional*. (42). Santiago de Chile.
- Mira, H., & Morante, J. (2020). Neurogenesis From Embryo to Adult – Lessons From Flies and Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00533>
- Monk, C., Georgieff, M. K., & Osterholm, E. A. (2013). Research review: Maternal prenatal distress and poor nutrition - mutually influencing risk factors affecting infant neurocognitive development. *Journal of*

*Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 54(2), 115-130.

<https://doi.org/10.1111/jcpp.12000>

- Mukhtar, T., & Taylor, V. (2018). Untangling Cortical Complexity During Development. *Journal of Experimental Neuroscience*, 12, 1179069518759332. <https://doi.org/10.1177/1179069518759332>
- Nagamitsu, S., Yamashita, Y., Tanigawa, H., Chiba, H., Kaida, H., Ishibashi, M., Kakuma, T., Croarkin, P. E., & Matsuishi, T. (2015). Upregulated GABA Inhibitory Function in ADHD Children with Child Behavior Checklist-Dysregulation Profile: 123I-Iomazenil SPECT Study. *Frontiers in Psychiatry*, 6, 84. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00084>
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: A pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)*, 390(10113), 2627-2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., ... Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, 384(9945), 766-781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8)
- Niculescu, M. D., & Lupu, D. S. (2009). High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 27(7), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.08.005>
- Obesity and overweight*. (s. f.). Recuperado 14 de mayo de 2024, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. (2000). *World Health Organization Technical Report Series*, 894, i-xii, 1-253.

- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., & Maekawa, M. (2008). Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *Stem Cells*, 26(7), 1663-1672. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0884>
- Pebworth, M.-P., Ross, J., Andrews, M., Bhaduri, A., & Kriegstein, A. R. (2021). Human intermediate progenitor diversity during cortical development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(26), e2019415118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019415118>
- Pflanz, N. C., Daszkowski, A. W., James, K. A., & Mihic, S. J. (2019). Ketone body modulation of ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 148, 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.013>
- Pronovost, G. N., & Hsiao, E. Y. (2019). Perinatal Interactions between the Microbiome, Immunity, and Neurodevelopment. *Immunity*, 50(1), 18-36. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.016>
- Rajasilta, O., Häkkinen, S., Björnsdotter, M., Scheinin, N. M., Lehtola, S. J., Saunavaara, J., Parkkola, R., Lähdesmäki, T., Karlsson, L., Karlsson, H., & Tuulari, J. J. (2021). Maternal pre-pregnancy BMI associates with neonate local and distal functional connectivity of the left superior frontal gyrus. *Scientific Reports*, 11(1), 19182. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98574-9>
- Rakic, P., Ayoub, A. E., Breunig, J. J., & Dominguez, M. H. (2009). Decision by division: Making cortical maps. *Trends in Neurosciences*, 32(5), 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.01.007>
- Reillo, I., de Juan Romero, C., García-Cabezas, M. Á., & Borrell, V. (2011). A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 21(7), 1674-1694. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq238>
- Reinius, B., & Jazin, E. (2009). Prenatal sex differences in the human brain. *Molecular Psychiatry*, 14(11), 988-989. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.79>
- Richardson, A. C., & Carpenter, M. W. (2007). Inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 34(2), 213-224, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2007.04.001>
- Riffo, B., Asenjo, S., Sáez, K., Aguayo, C., Muñoz, I., Bustos, P., Celis-Morales, C., Lagos, J., Sapunar, J., & Ulloa, N. (2012). FTO gene is related to obesity in Chilean Amerindian children and impairs

- HOMA-IR in prepubertal girls. *Pediatric Diabetes*, 13(5), 384-391. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2011.00834.x>
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology*, 71(1), 45-61. <https://doi.org/10.1002/dneu.20853>
- Sawicka, A., & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, 94(11), 2193-2201. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.018>
- Sessa, A., Mao, C., Hadjantonakis, A.-K., Klein, W. H., & Broccoli, V. (2008). Tbr2 Directs Conversion of Radial Glia into Basal Precursors and Guides Neuronal Amplification by Indirect Neurogenesis in the Developing Neocortex. *Neuron*, 60(1), 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.028>
- Sidman, R. L., & Rakic, P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: A review. *Brain Research*, 62(1), 1-35. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90617-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90617-3)
- Stachowiak, E. K., Srinivasan, M., Stachowiak, M. K., & Patel, M. S. (2013). Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metabolic brain disease*, 28(4), 10.1007/s11011-013-9437-9438. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9437-8>
- Stolp, H. B., Turnquist, C., Dziegielewska, K. M., Saunders, N. R., Anthony, D. C., & Molnár, Z. (2011). Reduced ventricular proliferation in the foetal cortex following maternal inflammation in the mouse. *Brain*, 134(11), 3236-3248. <https://doi.org/10.1093/brain/awr237>
- Stubert, J., Reister, F., Hartmann, S., & Janni, W. (2018). The Risks Associated With Obesity in Pregnancy. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(16), 276-283. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0276>
- Studer, M. (2011). The use and re-use of transcription factors during brain development. *Developmental Neurobiology*, 71(8), 663-664. <https://doi.org/10.1002/dneu.20915>
- Sullivan, E. L., Nousen, E. K., & Chamblou, K. A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiology & Behavior*, 123, 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.07.014>

- Sureshchandra, S., Marshall, N. E., Wilson, R. M., Barr, T., Rais, M., Purnell, J. Q., Thornburg, K. L., & Messaoudi, I. (2018). Inflammatory Determinants of Pregravid Obesity in Placenta and Peripheral Blood. *Frontiers in Physiology*, 9, 1089. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01089>
- Swinburn, B., Egger, G., & Raza, F. (1999). Dissecting obesogenic environments: The development and application of a framework for identifying and prioritizing environmental interventions for obesity. *Preventive Medicine*, 29(6 Pt 1), 563-570. <https://doi.org/10.1006/pmed.1999.0585>
- Taylor, P. D., Khan, I. Y., Lakasing, L., Dekou, V., O'Brien-Coker, I., Mallet, A. I., Hanson, M. A., & Poston, L. (2003). Uterine artery function in pregnant rats fed a diet supplemented with animal lard. *Experimental Physiology*, 88(3), 389-398. <https://doi.org/10.1113/eph8802495>
- Tissir, F., Lambert de Rouvroit, C., & Goffinet, A. M. (2002). The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 1473-1484. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002001200007>
- Tong, L., & Kalish, B. T. (2021). The impact of maternal obesity on childhood neurodevelopment. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 41(5), 928-939. <https://doi.org/10.1038/s41372-020-00871-0>
- Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., & Wada, K. (2010). Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochemistry International*, 57(3), 235-247. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.05.015>
- Valleau, J. C., & Sullivan, E. L. (2014). The impact of leptin on perinatal development and psychopathology. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 61-62, 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.05.001>
- Van Derveer, A. B., Bastos, G., Ferrell, A. D., Gallimore, C. G., Greene, M. L., Holmes, J. T., Kubricka, V., Ross, J. M., & Hamm, J. P. (2020). A Role for Somatostatin-Positive Interneurons in Neuro-Oscillatory and Information Processing Deficits in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 47(5), 1385-1398. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa184>
- Vasistha, N. A., Pardo-Navarro, M., Gasthaus, J., Weijers, D., Müller, M. K., García-González, D., Malwade, S., Korshunova, I., Pfisterer, U., von Engelhardt, J., Hougaard, K. S., & Khodosevich, K. (2020). Maternal inflammation has a profound effect on cortical interneuron development in a stage and

- subtype-specific manner. *Molecular Psychiatry*, 25(10), 2313-2329. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0539-5>
- Vásquez, A., Lukas, M., Salgado, M., & Mayorga, J. M. (2017). *Urban environmental (in)justice in Latin America: The case of Chile*. (pp. 556-666). <https://doi.org/10.4324/9781315678986>
- Villa, L. M., Hampton, S., Aydin, E., Tait, R., Leming, M. J., Tsompanidis, A., Patterson, I., Allison, C., Austin, T., Suckling, J., Baron-Cohen, S., & Holt, R. J. (2021). *Sex differences in brain development in fetuses and infants who are at low or high likelihood for autism* (p. 2021.03.08.21251862). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.03.08.21251862>
- Wallace, J. M., Milne, J. S., Matsuzaki, M., & Aitken, R. P. (2008). Serial measurement of uterine blood flow from mid to late gestation in growth restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep dams. *Placenta*, 29(8), 718-724. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.05.006>
- Wamsley, B., & Fishell, G. (2017). Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(5), 299-309. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.30>
- Wonders, C. P., & Anderson, S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(9), 687-696. <https://doi.org/10.1038/nrn1954>
- Xu, X., Roby, K. D., & Callaway, E. M. (2006). Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *The Journal of Comparative Neurology*, 499(1), 144-160. <https://doi.org/10.1002/cne.21101>
- Zhang, L., Song, N.-N., Chen, J.-Y., Huang, Y., Li, H., & Ding, Y.-Q. (2012). Satb2 is required for dendritic arborization and soma spacing in mouse cerebral cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 22(7), 1510-1519. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr215>
- Zhang, Z., Li, N., Chen, R., Lee, T., Gao, Y., Yuan, Z., Nie, Y., & Sun, T. (2021). Prenatal stress leads to deficits in brain development, mood related behaviors and gut microbiota in offspring. *Neurobiology of Stress*, 15, 100333. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100333>
- Zhou, J., Tong, J., Ru, X., Teng, Y., Geng, M., Yan, S., Tao, F., & Huang, K. (2023). Placental inflammatory cytokines mRNA expression and preschool children's cognitive performance: A birth cohort study in China. *BMC Medicine*, 21(1), 449. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03173-2>