



Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados

del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Sur

Departamento de Farmacobiología

**Alteraciones en la Integración Sináptica de la Región CA1
del Hipocampo en un Modelo de Activación Inmune
Materna**

Tesis que presenta:

M. en C. Ernesto Griego Melo

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de Tesis:

Dr. Emilio J. Galván Espinosa

Ciudad de México

Noviembre 2022

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 9, bajo la dirección del Dr. Emilio Javier Galván Espinosa. El laboratorio 9 es uno de los laboratorios que integran el Departamento de Farmacobiología de la Unidad Sur del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Para la realización de este proyecto, se contó con el apoyo del proyecto CB-281617 a nombre del Dr. Emilio J. Galván Espinosa y con la beca 727269; los recursos fueron otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

Agradecimientos

A mi director de tesis, Dr. Emilio Galván, por el apoyo y plena confianza. Ha sido una experiencia extraordinaria haber formado parte de su equipo.

A mi comité sinodal formado por la Dra. Mónica Lamas y los Dres. Rafael Gutiérrez, Rodolfo Delgado y José de Jesús Aceves. Por los comentarios, preguntas y consejos que hicieron en cada avance de resultados y que enriquecieron este proyecto.

Al Dr. Marco Fuenzalida, y su equipo, por haberme recibido en su laboratorio, por la enseñanza y por su amistad.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio por la enseñanza y los buenos momentos. Así como a nuestro técnico y amigo mío Juan Javier, por su apoyo, que es invaluable. Por cada taza de exquisito café. Pero, sobre todo por su amistad.

A los viejos amigos que nunca olvido. A los nuevos amigos que durante este periodo he conocido.

A las organizaciones e instituciones académicas que apoyaron mi formación de diferentes formas: CONACyT, CINVESTAV, SfN, IBRO, LATP, Universidad de Valparaíso, Universidad de la República, IIBCE, etc.

A mis padres y hermanos, que han estado siempre presentes. Por ser mi ejemplo, mi punto de apoyo y mi mayor orgullo. Va por ustedes este logro.

A mi mejor amiga y compañera de vida. A ti Deisy por ser amorosa e infinitamente paciente. Por ayudarme a entender este mundo y darle color a mi vida. A ti te dedico esta tesis, que no hubiera escrito tan dichosamente sino hubieras estado presente en todo momento.

“Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world”.

Louis Pasteur

Lista de abreviaturas

E-I: excitación-inhibición

EPSC: corriente postsináptica excitadora

EPSP: potencial postsináptico inhibitorio

GABA: ácido gamma aminobutírico

GD: día gestacional

I_A : corriente de potasio tipo A

I_D : corriente de potasio tipo D

I_{clamp} : fijación de corriente

$I\kappa B$: inhibidor de $NF\kappa B$

$I\kappa K$: cinasa de $I\kappa B$

IN PV+: interneurona parvalbuminérgica

IN CCK+: interneurona colecistínica

IPSC: corriente postsináptica inhibitoria

IRAK: cinasas asociadas al receptor de IL1

LPS: lipopolisacárido

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógeno

MIA: activación inmune materna

$NF\kappa B$: factor nuclear kappa B

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PND: día postnatal

Poly I:C: ácido poliinosínico:policitidílico

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

SLm: stratum lacunosum moleculare

SNC: sistema nervioso central

SO: stratum oriens

SP: stratum pyramidale

SR: stratum radiatum

TAK1: cinasa activada por TGF- β

TEA: trastornos del espectro autista

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TIR: dominio de receptor toll-IL1

TLR: receptores tipo toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral alpha

TRAF: factor asociado al receptor de TNF

V_{clamp}: fijación de voltaje

Tabla de Contenidos	
Lista de abreviaturas	iii
Lista de figuras y tablas	vii
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	4
1.1. Neurodesarrollo y la influencia del sistema inmune	5
1.2. Activación inmune materna y trastornos del neurodesarrollo	9
1.2.1. LPS y señalización dependiente de TLR4	10
1.2.2. Mecanismos moleculares asociados a la activación inmune materna	12
1.3. La formación hipocampal	13
1.3.1. Anatomía y circuitería del hipocampo	14
1.3.2. Anatomía y fisiología celular de la región CA1 del hipocampo	16
1.4. Fisiología y biofísica de la integración sináptica	19
1.4.1. Geometría dendrítica y biofísica neuronal	20
1.4.2. Inhibición GABAérgica perisomática	22
2. Justificación	26
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. Metodología	28
5.1. Animales y diseño experimental	28
5.2. Medición de la temperatura corporal	29
5.3. Determinación de niveles séricos de citocinas por ELISA	29
5.4. Electrofisiología	29
5.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	37
5.6. Análisis morfométrico neuronal	39
5.7. Análisis de la transcripción de citocinas por RT-qPCR	40
6. Análisis estadístico	42
7. Resultados	43
7.1. La inyección de LPS en ratonas gestantes induce una respuesta inflamatoria sistémica y reduce el número de crías por camada	43

7.2. La MIA incrementa la sumación temporal en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia	44
7.3. La activación inmune materna incrementa la sumación espacial en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia	45
7.4 La activación inmune materna incrementa la excitabilidad intrínseca de neuronas piramidales de CA1 de la descendencia	47
7.5. La activación inmune materna altera las propiedades biofísicas de la corriente de K ⁺ tipo A	50
7.6. La activación inmune materna reduce la complejidad morfológica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia	52
7.7 La activación inmune materna reconfigura el balance excitación-inhibición en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia	54
7.8. La activación inmune materna disminuye la inhibición GABAérgica mediada por interneuronas PV+ y CCK+ en la descendencia	57
7.9. El bloqueo de la transmisión GABAérgica normaliza la integración sináptica en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.	60
7.10. Las alteraciones neurofisiológicas y neuroanatómicas en el hipocampo de la descendencia no se acompañan de un estado neuroinflamatorio 63	
8. Discusión	67
8.1. La activación inmune materna incrementa la integración sináptica y la excitabilidad neuronal en el hipocampo	67
8.2. La activación inmune materna altera la complejidad y geometría neuronal	70
8.3. La activación inmune materna altera el equilibrio E-I y reduce la inhibición perisomática en la descendencia	71
8.4. Ausencia de indicadores de neuroinflamación aguda en la descendencia	72
9. Conclusión	74
10. Perspectivas	75
Referencias	76

Lista de figuras y tablas

Figura 1 Vía de señalización canónica del TLR4 en respuesta al reconocimiento de LPS.	11
Figura 2 Circuitería básica de la formación hipocampal.....	16
Figura 3 Morfología y principales conexiones sinápticas de las neuronas piramidales de CA1.....	18
Figura 4 Inhibición perisomática complementaria sobre las neuronas piramidales de CA1.....	24
Figura 5 La administración sistémica de LPS induce MIA y disminuye el número de crías por camada.....	44
Figura 6 La MIA inducida por LPS aumenta la sumación temporal en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.	46
Figura 7 La MIA inducida por LPS prolonga la ventana de integración espacial en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.....	47
Figura 8 La MIA inducida por LPS incrementa la excitabilidad intrínseca y la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de la descendencia.....	49
Figura 9 La MIA inducida por LPS disminuye la expresión funcional y altera las propiedades biofísicas de la I_{KA} en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.....	51
Figura 10 La MIA inducida por LPS disminuye la complejidad morfológica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.....	54
Figura 11 La MIA inducida por LPS disminuye la inhibición y reconfigura el balance E-I en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.....	57
Figura 12 La MIA inducida por LPS reduce el número de células inmunorreactivas a GAD67 en el área CA1 de la descendencia.....	58
Figura 13 La MIA inducida por LPS reduce el efecto del WIN 55, 212-2 en la amplitud de las IPSC registradas en neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.....	59
Figura 14 La MIA inducida por LPS reduce el efecto del DAMGO en la amplitud de las IPSC registradas en neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.....	60
Figura 15 El bloqueo farmacológico de la transmisión GABAérgica normaliza los cambios observados en la sumación temporal en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA.	62

Figura 16 El bloqueo farmacológico de la transmisión GABAérgica normaliza los cambios observados en la sumación espacial en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. 63

Figura 17 La MIA inducida por LPS no altera significativamente la densidad de astrocitos y microglía en el hipocampo dorsal de la descendencia. 65

Figura 18 La MIA inducida por LPS no produce un estado neuroinflamatorio que persista hasta la edad juvenil en la descendencia. 66

Resumen

La activación inmune maternal (MIA) es considerada en la actualidad un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos asociados a alteraciones en el neurodesarrollo. Un cuerpo creciente de estudios en roedores y primates no humanos han reportado que la MIA inducida, ya sea por infecciones virales o bacterianas, desencadena una serie de alteraciones neurobiológicas en la descendencia que podrían contribuir a la fisiopatología de trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia y los trastornos del espectro autista, cuya clínica incluye alteraciones en el procesamiento cognitivo. Se ha demostrado que dichas alteraciones están causalmente asociadas con la respuesta inflamatoria materna ante la infección, más que con la infección por sí misma. Sin embargo, las potenciales alteraciones neurofisiológicas y neuroanatómicas a nivel celular y sináptico en áreas de gran relevancia en la fisiopatología de tales trastornos neuropsiquiátricos, como el hipocampo dorsal, no han sido completamente caracterizadas.

En este trabajo nos planteamos identificar y caracterizar las alteraciones electrofisiológicas y morfológicas en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal de ratón en un modelo de MIA inducida por LPS bacteriano. Nuestros datos demostraron que la MIA induce un incremento en la excitabilidad neuronal, así como una reducción en la complejidad morfológica neuronal en la descendencia. Del mismo modo, la MIA inducida por LPS reconfigura el balance excitación-inhibición, reduciendo la inhibición GABAérgica perisomática que reciben las neuronas piramidales de CA1. Todas estas alteraciones conducen a una amplificación de la integración sináptica, tanto en su componente temporal como espacial.

En conjunto, los hallazgos reportados en esta tesis ayudan a explicar las alteraciones celulares y sinápticas que subyacen a los síntomas cognitivos presentes en trastornos del neurodesarrollo asociados con la MIA.

Abstract

Maternal immune activation (MIA) is currently considered a risk factor for the development of neuropsychiatric disorders associated with neurodevelopmental alterations. A growing body of research in rodents and non-human primates has shown that MIA caused by either viral or bacterial infections results in several neurobiological changes in the offspring. These changes may impact the pathophysiology of neuropsychiatric disorders like schizophrenia and autism spectrum disorders, which have clinical features that include changes in cognitive processing. Such alterations are causally associated with the maternal inflammatory response to infection rather than with the infection itself. However, potential neurophysiological and neuroanatomical alterations at the cellular and synaptic levels in areas of critical relevance in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders such as the dorsal hippocampus, have not been fully characterized.

In this work we aim to identify electrophysiological and morphological alterations of pyramidal neurons of the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus in a model of bacterial LPS-induced MIA. Our data demonstrate that MIA increases neuronal excitability and reduces the morphological complexity of pyramidal neurons of the offspring. Likewise, LPS-induced MIA reconfigures the excitation-inhibition balance, by decreasing the perisomatic GABAergic inhibition impinging on CA1 pyramidal neurons. These alterations yield to a dysregulated amplification of the temporal and spatial synaptic integration.

Taken together, the findings reported in this work help to explain the cellular and synaptic alterations underlying the cognitive symptoms present in neurodevelopmental disorders associated with MIA.

1. Introducción

El estudio del cerebro ha sido un tema de fascinación a lo largo de la historia de la humanidad, y los descubrimientos acerca de su funcionamiento nos han acercado a la posibilidad de entender la naturaleza de las más complejas características que nos definen como seres vivos, y más aún como seres pensantes. La idea de identificar las bases orgánicas de fenómenos tan exquisitamente complejos, como la adquisición de memorias y aprendizajes, el origen de sentimientos y los principios que gobiernan el fenómeno genéricamente conocido como conciencia, posiciona al estudio del cerebro como una ciencia de excepcional importancia en nuestros días. Aunque en los últimos 100 años la revolución tecnológica ha permitido obtener datos y conocimientos invaluable acerca de los principios que rigen el funcionamiento del cerebro en condiciones fisiológicas normales, sigue habiendo un sinnúmero de preguntas esperando ser resueltas, particularmente en lo que respecta a las alteraciones que conducen a trastornos de la mente. Esto es, aquellos desórdenes psiquiátricos caracterizados por perturbaciones en la cognición, la personalidad y la percepción de la realidad.

Para intentar dar respuesta a estas interrogantes, se han diseñado y validado modelos animales que permiten estudiar el cerebro en diferentes etapas de su desarrollo y desde diferentes aproximaciones. Gracias a estos modelos, hoy sabemos que variaciones sutiles en el desarrollo pueden conducir a disfunciones cuyo impacto en el adecuado funcionamiento del cerebro puede ser catastrófico. En años recientes, la relación entre inflamación materna y alteraciones del neurodesarrollo en la descendencia se ha convertido en un área de estudio capital en la neurociencia. Esto debido a que se ha documentado que el sistema inmune materno ejerce una gran influencia en el desarrollo fetal, incluido el cerebro. En ese sentido, fluctuaciones en la actividad del sistema inmune materno pueden tener efectos perniciosos en la fisiología del cerebro fetal. En esta tesis se describe meticulosamente un modelo murino de activación inmune materna inducida por antígenos bacterianos y sus efectos en algunos de los aspectos más complejos de

la neurofisiología, como la excitabilidad intrínseca, la integración sináptica, y la morfología neuronal. Así mismo, se discute su relevancia en el contexto del estudio de algunos trastornos neuropsiquiátricos asociados a alteraciones en el neurodesarrollo.

1.1. Neurodesarrollo y la influencia del sistema inmune

El sistema nervioso central (SNC) fue considerado por muchos años como un compartimento inmunológicamente privilegiado, en el que cualquier señal de presencia de células y/o moléculas inmunes era percibido como un signo de patología inflamatoria. Sin embargo, la investigación continua en este campo ha puesto en evidencia la existencia de una profunda comunicación recíproca entre el sistema inmune y el SNC. Datos experimentales han mostrado que la comunicación neuroinmune es sustancial y fisiológicamente relevante a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo, por lo que perturbaciones en ella pueden conducir a alteraciones fisiopatológicas diversas. Por ejemplo, estudios en ratones con inmunodeficiencia combinada severa muestran que esos animales expresan deterioro en pruebas cognitivas, lo cual es revertido mediante el trasplante de médula ósea para repoblarlos de linfocitos T. Del mismo modo, ha sido documentado que la depleción aguda de la inmunidad adaptativa en ratones adultos genera efectos negativos en la cognición (Brynskikh et al., 2008).

En ese sentido, queda patente que el sistema inmune contribuye al correcto desarrollo del SNC. En particular, componentes moleculares del sistema inmune innato, incluyendo receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR), citocinas, proteínas del sistema de complemento, así como señales fagocíticas son jugadores críticos en el neurodesarrollo. Dichas moléculas han sido detectadas en el SNC sin ninguna señal de inflamación o lesión, lo que sugiere que ejecutan funciones homeostáticas a nivel nervioso, controlando diferentes aspectos del establecimiento y maduración de los circuitos neuronales en el cerebro (Zengeler & Lukens, 2021).

Microglía y su rol en el neurodesarrollo

En el cerebro coexisten diferentes poblaciones de células del sistema inmune. Por ejemplo, se ha reportado que células dendríticas (CD11+), así como linfocitos B y T están presentes en el cerebro en desarrollo, donde promueven la maduración de la microglía (Tanabe & Yamashita, 2018). Células cebadas también residen en el cerebro en desarrollo, así como en el cerebro adulto donde están involucradas en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Silver & Curley, 2013; Forsythe, 2019). No obstante, dado que son las principales células del sistema inmune innato en el cerebro, el rol de la microglía en el neurodesarrollo ha sido estudiado con más detalle (para consultar Cowan & Petri, 2018). En ese sentido, se sabe que la microglía contribuye de manera importante en el neurodesarrollo al modular diferentes aspectos, como la neurogénesis y la poda sináptica. En consecuencia, el detrimento de las funciones de la microglía puede conducir a alteraciones importantes en el neurodesarrollo y, en consecuencia, en las funciones del cerebro maduro.

La microglía comienza a colonizar el SNC de roedores en el día gestacional 8 (GD8), mientras que se cree que el SNC humano comienza a ser colonizado a partir de la cuarta semana de gestación (Monier et al., 2007; Kierdorf & Prinz, 2013; Lenz & Nelson, 2018). La colonización del cerebro inmaduro por la microglía precede fenómenos fundamentales del neurodesarrollo tales como la neurogénesis, la migración neuronal y la sinaptogénesis. Dichos fenómenos sugieren que la microglía juega un papel relevante en el adecuado progreso de tales eventos. La microglía es altamente sensible a perturbaciones ambientales, tales como procesos inflamatorios, y responde a dichos estímulos secretando moléculas de diversa naturaleza, como factores de crecimiento y citocinas tanto pro- como antiinflamatorias (S. U. Kim & de Vellis, 2005). Las moléculas que libera la microglía en el parénquima cerebral modulan diferentes aspectos tanto del cerebro en desarrollo como del cerebro maduro. Así, además de estar implicada en la neurogénesis y migración neuronal, la microglía juega un rol importante en la

modulación del crecimiento y orientación de neuritas durante el neurodesarrollo (Pont-Lezica et al., 2011) y participa en la formación de circuitos neuronales al regular el refinamiento y plasticidad morfológica y sináptica del cerebro en formación.

Receptores de la inmunidad innata y su papel en el neurodesarrollo

Diferentes moléculas y receptores propios de la inmunidad innata están presentes en el cerebro en desarrollo, siendo expresados en todas las células residentes del SNC, tanto neuronas como glía. Por ejemplo, se sabe que PRRs como los TLRs están expresados en la microglía y en células progenitoras neurales en el cerebro en desarrollo (Kaul et al., 2012), pero también se ha demostrado que los TLRs forman parte del repertorio de receptores presentes en las neuronas del cerebro maduro (Bsibsi et al., 2002).

Además de su rol como receptores especializados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los TLRs están involucrados en procesos que ocurren durante el neurodesarrollo, como la neurogénesis y la configuración de la morfología neuronal (Chen et al., 2019). En ese sentido, la activación anormal de los diferentes TLRs, tales como el TLR3 y TLR4, durante fases críticas del neurodesarrollo es por sí misma un factor de riesgo para la aparición de trastornos neuropsiquiátricos asociados a alteraciones del neurodesarrollo, como la esquizofrenia y los trastornos del espectro autista (TEA). Por ejemplo, se ha reportado que la activación del TLR3, un receptor especializado en el reconocimiento de antígenos virales, inhibe el crecimiento dendrítico y la sinaptogénesis (Hung et al., 2018). En contraste, otros reportes señalan que la delección genética del TLR3 conduce a alteraciones conductuales. Por ejemplo, los ratones genéticamente modificados para no expresar al TLR3 (TLR3^{-/-}) muestran un aprendizaje y capacidades mnemónicas potenciadas en pruebas dependientes del hipocampo (Okun et al., 2010), lo cual puede deberse a la influencia que tiene este receptor en la modulación de la excitabilidad intrínseca neuronal (Ritchie et

al., 2018). Así mismo, se ha documentado que el TLR4, cuyo ligando natural es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), desempeña un papel relevante en la fisiología hipocampal. Por ejemplo, ratones mutantes que no expresan al receptor TLR4 (TLR4^{-/-}) exhiben un mejor desempeño al ser evaluado su aprendizaje y memoria espacial en pruebas dependientes del hipocampo, efectos que son acompañados por la reconfiguración de la neurotransmisión glutamatérgica (Okun et al., 2012)

Como los TLRs, hay otros receptores de la inmunidad innata presentes en el SNC a lo largo de todas sus etapas de desarrollo, los cuales modulan aspectos fundamentales de la función cerebral, cuya discusión trasciende el contenido de esta tesis.

Citocinas

Otros elementos de la inmunidad que ejercen control en el neurodesarrollo son las citocinas, pues participan en procesos como la neurogénesis y la gliogénesis (Deverman & Patterson, 2009). Por ejemplo, la estimulación del receptor común de la IL-1 α e IL-1 β , el IL-1R1, activa una vía de señalización dependiente de MYD88 que conduce a la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y del factor de nuclear κ B (NF κ B). A través de estas vías de señalización, las citocinas de la familia de la IL-1 estimulan o inhiben la neurogénesis, dependiendo del contexto fisiológico en que se encuentren (Wang et al., 2007; Zunszain et al., 2012; Borsini et al., 2015). Adicionalmente, las citocinas de esta familia están involucradas en otros fenómenos importantes del neurodesarrollo como la gliogénesis, la migración y el desarrollo morfológico neuronal (Boato et al., 2011; Nolan et al., 2011). Otras citocinas que participan en el neurodesarrollo son la IL6 y la IL-17. El caso de estas dos citocinas proinflamatorias es de particular relevancia ya que han sido propuestas como potenciales efectores moleculares de las alteraciones neurobiológicas en la descendencia asociadas a la activación inmune materna (MIA), ya sea esta de origen viral o bacteriano (Choi et al., 2016; Gumusoglu et al., 2017).

1.2. Activación inmune materna y trastornos del neurodesarrollo

Tan complejo y sofisticado como es el neurodesarrollo, este proceso requiere una minuciosa coordinación y organización en todos los sentidos. De tal forma que el neurodesarrollo se encuentra bajo modulación permanente, tanto por el sistema inmune, como por factores genéticos y ambientales. Cualquier irrupción en algunos de las etapas del neurodesarrollo conducirá inequívocamente a alteraciones funcionales en el cerebro. En ese sentido, insultos durante etapas específicas del neurodesarrollo pueden alterar la trayectoria de este, conduciendo a trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia y el TEA. La MIA es uno de tantos eventos potencialmente nocivos a los que un organismo en desarrollo puede estar expuesto. La MIA ocurre en respuesta a infecciones asociadas a diferentes agentes etiológicos, tanto de naturaleza viral como bacteriana. En las últimas décadas una gran cantidad de estudios, fundamentalmente epidemiológicos, han reportado un mayor riesgo de desarrollar trastornos neuropsiquiátricos, como el TEA y la esquizofrenia, en personas cuyas madres sufrieron algún tipo de infección durante el embarazo (Patterson, 2011; Estes & McAllister, 2016; Han et al., 2021).

Más recientemente, el modelado experimental de la MIA utilizando roedores permitió identificar algunas alteraciones neurobiológicas en la descendencia reminiscentes de los trastornos asociados a la MIA en humanos (Estes & McAllister, 2016; Brown & Meyer, 2018; Haddad et al., 2020). Dichas alteraciones, sin embargo, dependen de diferentes variables como el periodo gestacional en el cual se induce la activación inmune, el tiempo de exposición al inductor de la activación inmune, a la naturaleza misma del agente inductor, y finalmente a la intensidad de la respuesta inmune montada por el organismo materno (Bergdolt & Dunaevsky, 2019). En la presente tesis se utilizó un modelo de MIA mediante la administración sistémica de lipopolisacárido (LPS), a fin de mimetizar una infección de origen bacteriano. El modelado con LPS cumple con todos los criterios de validación requeridos para un modelo experimental funcional. Por esta razón, en la siguiente

sección se describirá con detalle la transducción de señales asociadas al reconocimiento del LPS por TLR4 en el sistema inmune.

1.2.1. LPS y señalización dependiente de TLR4

La MIA es inducida por antígenos con la capacidad de estimular el sistema inmune innato, los cuales pueden ser moléculas antigénicas de naturaleza viral o bacteriana. En el caso de los antígenos virales, estos suelen ser fundamentalmente ácidos ribonucleicos de cadena sencilla de la estructura viral, los cuales pueden ser mimetizados experimentalmente mediante el uso de moléculas sintéticas como el ácido poliinosínico:policitidílico (poly i:c) (Reisinger et al., 2015). Por otro lado, aunque utilizado en menor medida que el poly i:c para mimetizar la MIA, el LPS es el principal antígeno bacteriano asociado a la activación de la respuesta inmune innata en humanos, por lo que es de particular relevancia en nuestro medio.

El LPS es un componente primario de la membrana externa de bacterias gram negativas, cuya estructura química y actividad biológica han sido bien estudiadas. La interacción del LPS con células eucariotas en mamíferos ocurre a través de la estimulación de diferentes receptores expresados en células de todo el organismo, incluyendo a PRRs como el TLR4 (Lu et al., 2008). Aunque el TLR4 es el principal receptor que reconoce al LPS, dicha interacción requiere de proteínas coadyuvantes, como CD-14, cuya función primaria es facilitar la transferencia del LPS al complejo formado por el TLR4 y otra molécula llamada MD2. Una vez que dicho complejo reconoce al LPS, el TLR4 se polimeriza mediante la interacción con dominios de receptor Toll-IL1 (TIR). Los dominios TIR son esenciales para la adecuada transducción de señales dependientes del TLR4. En ese sentido, mediante la interacción con los dominios TIR, el TLR4 puede activar las vías de señalización canónicas en respuesta al LPS. La vía de señalización canónica o dependiente de MyD88 conduce a la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias (Takeda & Akira, 2004; Lu et al., 2008). Tras su reclutamiento, MyD88 activa a la cinasa 4 asociada al receptor de IL1 (IRAK4), que a su vez fosforila y recluta a IRAK1. A través de IRAK1 se reclutan otras proteínas como el

factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) y la cinasa1 activada por TGF- β (TAK1) cuya activación conduce a la activación de la cinasa de $\text{I}\kappa\text{B}$ (IKK) y de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). El reclutamiento de diferentes isoformas de IKK conduce a la degradación de $\text{I}\kappa\text{B}$, una cinasa que actúa como represor del factor nuclear κB (NF κB). Así, NF κB puede translocar al núcleo donde controla la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias y otros genes relacionados con la respuesta inmune innata (Mitchell et al., 2016). Por otro lado, la incorporación de las MAPK conduce a la activación del factor de transcripción AP1, el cual está involucrado en la regulación transcripcional de otras citocinas proinflamatorias (Shaulian & Karin, 2002). La vía de señalización canónica activada tras la estimulación del TLR4 está resumida en la figura 1.

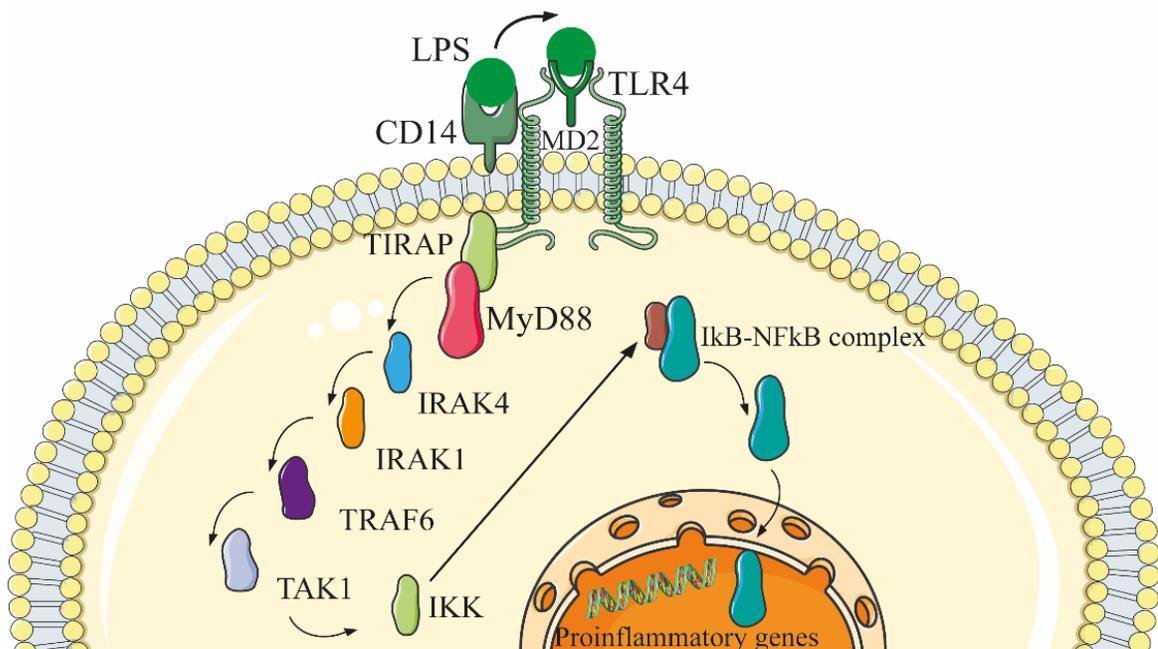


Figura 1 Vía de señalización canónica del TLR4 en respuesta al reconocimiento de LPS. Mediante la interacción con MyD88, el TLR4 activa a múltiples cinasas como IRAK4 e IRAK1, cuyo reclutamiento conduce a la activación y translocación al núcleo de NF κ B, un factor de transcripción que controla la síntesis de citocinas proinflamatorias.

1.2.2. Mecanismos moleculares asociados a la activación inmune materna

Aunque se han descrito múltiples mecanismos como potenciales responsables de las consecuencias de la MIA en el neurodesarrollo, realmente no se ha alcanzado un consenso acerca de cuál es el mecanismo crítico detrás de los efectos perniciosos de la MIA en la descendencia. Lo que es indiscutible es que la MIA puede alterar el fino balance que existe en la comunicación entre el sistema inmune materno y el cerebro fetal. La mayoría de los reportes coinciden que un desbalance en la expresión y función de citocinas y sus receptores en la interfaz materno-fetal, y en consecuencia en el cerebro fetal, es probablemente uno de los eventos críticos que subyacen las alteraciones asociadas a la MIA (Boulanger-Bertolus et al., 2018; Solek et al., 2018). En ese sentido, se ha identificado que la IL-6 y la IL-17 son 2 de los mediadores moleculares con más influencia en la neuropatología encontrada en modelos experimentales de MIA, inducida tanto por inmunógenos virales como bacterianos (Parker-Athill & Tan, 2010; Choi et al., 2016; Gumusoglu et al., 2017). Ambas citocinas están bajo la regulación del factor transcripcional NFκB, por lo que su transcripción es estimulada tras la activación del receptor TLR4.

En condiciones fisiológicas, las citocinas (y otras moléculas de la inmunidad innata), juegan un papel importante en las cascadas de señalización involucradas en el neurodesarrollo (Ratnayake et al., 2013), por lo que es factible hipotetizar que su actividad anormal en el cerebro fetal podría tener una relación causal con las alteraciones neuroquímicas durante el desarrollo pre- y postnatal. La MIA produce defectos en la maduración de las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas positivas a parvalbumina (IN PV+) del hipocampo y la corteza prefrontal (Canetta et al., 2016; Vasistha et al., 2020). El mecanismo propuesto para explicar tales defectos es una disrupción de los procesos moleculares que dirigen la migración neuronal de las interneuronas GABAérgicas (Oskvig et al., 2012). Lo anterior se refleja en una potencial disminución de la inhibición GABAérgica mediada por IN

PV+, además de otras subpoblaciones como las interneuronas positivas a colecistocinina (IN CCK+). Consistente con esta pérdida de la inhibición GABAérgica, se han reportado que la MIA produce alteraciones en la actividad rítmica del cerebro, particularmente un incremento de poder en la banda theta (θ) así como reducción en la coherencia electroencefalográfica específicamente en el hipocampo (Dickerson et al., 2010).

Adicionalmente, se ha reportado que la MIA inducida tanto por LPS como por poly i:c conduce a alteraciones en la excitabilidad intrínseca, así como en la morfología de diferentes tipos de neuronas, incluyendo a las neuronas piramidales del hipocampo (Savanthrapadian et al., 2013; Weir et al., 2015; Patrich et al., 2016). Todos estos cambios celulares inducidos por la MIA conducirían a conductas aberrantes en la descendencia de ratonas cuyo sistema inmune fue retado durante periodos específicos de la gestación. Por ejemplo, se ha documentado el desarrollo de síntomas similares a las observadas en pacientes diagnosticados con TEA, como interacción social disminuida y conductas estereotipadas repetitivas. Del mismo modo, se han reportado alteraciones conductuales reminiscentes de aquellas observadas en pacientes con esquizofrenia, como filtrado sensoriomotor y memoria de trabajo disminuidas, así como conductas tipo ansiedad (Minakova & Warner, 2018; Bergdolt & Dunaevsky, 2019). Resulta fascinante que tales alteraciones conductuales suelen responder positivamente a tratamientos farmacológicos empleados en la terapéutica psiquiátrica, lo que da aún mayor relevancia a este tipo de modelos para estudiar los mecanismos fisiopatológicos a escala celular y molecular, mismos que en humanos resulta virtualmente imposible de explorar.

1.3. La formación hipocampal

El hipocampo es una estructura altamente conservada localizada en el lóbulo temporal medial de los mamíferos que participa en los procesos de formación de la memoria y en la codificación de la localización espacial, y que, junto con la

corteza entorrinal, el giro dentado y el subículo constituyen la formación hipocampal. El hipocampo ha sido la estructura a través de la cual, muchos de los preceptos generales de la neurociencia moderna han podido ser establecidos (Bliss & Collingridge, 1993; Bird & Burgess, 2008). Adicionalmente, el hipocampo ha sido el área cerebral de elección para el estudio de la fisiología y la fisiopatología, no solo de trastornos neurológicos sino también psiquiátricos. En el contexto de los trastornos neuropsiquiátricos, el hipocampo está implicado en la fisiopatología de un gran número de ellos, incluida la esquizofrenia, el TEA y múltiples tipos de demencias (Booth et al., 2014; Tamminga et al., 2012).

1.3.1. Anatomía y circuitería del hipocampo

Una de las características que más entusiasmo genera es su neuroanatomía. El entendimiento de la arquitectura hipocampal ha permitido descifrar algunas de las más emblemáticas características funcionales de esta estructura cerebral, por ejemplo, es una de las pocas regiones cerebrales que reciben información sensorial multimodal altamente procesada de una gran variedad de orígenes corticales. La habilidad de los circuitos hipocampales para integrar información sensorial de diferente naturaleza radica en la exquisita organización de sus conexiones neuronales. Anatómicamente, y desde una perspectiva coronal, el hipocampo tiene una estructura en forma de C que protruye hacia el cuerno inferior del ventrículo lateral. Se subdivide en cuernos de Amón (CA) 3, 2 y 1. Desde su capa más profunda hasta la superficie, el hipocampo ha sido dividido en 5 a 6 capas o estratos: *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidale* (SP), *stratum lucidum* (SL, localizado únicamente en la región CA3), *stratum radiatum* (SR) y *stratum lacunosum-moleculare* (Slm). En el hipocampo existen dos grandes familias de neuronas, las neuronas principales o piramidales, y las interneuronas. Las neuronas piramidales tienen su soma localizado en el *stratum pyramidale*, mientras que las interneuronas se distribuyen en todos los *strata* hipocampales.

El hipocampo posee una arquitectura histológica altamente organizada que ha facilitado el análisis detallado de su conectividad. En ese sentido, el papel

fisiológico de la formación hipocampal está íntimamente ligado con su citoarquitectura (Lisman, 1999), por lo que su organización anatómica y funcional es de particular relevancia. La organización histológica y celular del hipocampo es tal que su circuitería básica fue inferida a partir de estudios anatómicos en los que se usaron técnicas de tinción y de microscopía relativamente rudimentarios. En este contexto, los trabajos del Maestro Santiago Ramón y Cajal permitieron las primeras aproximaciones detalladas de la conectividad y el flujo de información a través de la estructura hipocampal, originando el (ahora arcaico) concepto de “circuito trisináptico” (Figura 2). Naturalmente, estudios más recientes han permitido el reconocimiento de una circuitería hipocampal más sofisticada, incluyendo subcircuitos y mecanismos de comunicación alternativos, más allá de la doctrina clásica del circuito trisináptico. Desde un punto de vista reduccionista, y acotándonos al circuito trisináptico, el primer relevo sináptico al hipocampo es externo, mediante los axones de las células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal (o vía perforante), que hacen sinapsis con células granulares del giro dentado y con la región dendrítica distal de las neuronas piramidales de CA3. Las células granulares envían sus axones o fibras musgosas a través del SL de la región CA3 donde contactan a neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas. A su vez, las neuronas piramidales de CA3 envían sus axones, denominados colaterales de Schaffer, a la región CA1, pero también contactan a otras neuronas piramidales de CA3, formando una red autoasociativa de axones colaterales. Por último, los axones de las neuronas principales de CA1 constituyen la salida de la información del hipocampo, la cual regresa a la corteza entorrinal y al subículo (Knierim & Neunuebel, 2016).

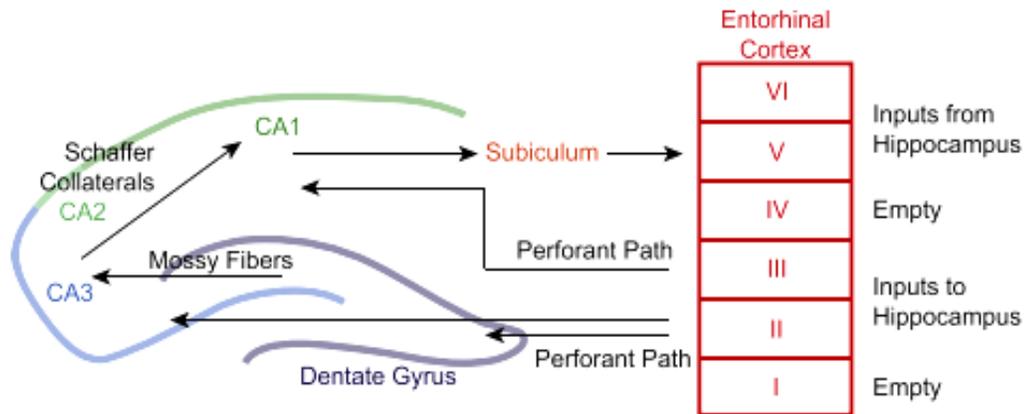


Figura 2 Circuitería básica de la formación hipocampal. Tomada de (Fröhlich, 2016).

1.3.2. Anatomía y fisiología celular de la región CA1 del hipocampo

La región CA1 del hipocampo es probablemente el núcleo más ampliamente estudiado, no solo del hipocampo sino de todo el cerebro. Esta región participa de manera crítica en la fisiología de la memoria episódica, particularmente durante el proceso de adquisición de memorias declarativas, esto es: recordar eventos, hechos y lugares (Remondes & Schuman, 2004; Daumas et al., 2005; Farovik et al., 2010). La principal capa celular del área CA1, y del hipocampo en sí, es el SP, lugar donde se encuentran los somas de las neuronas piramidales. El SP de CA1 está densamente empaquetado, comparado con CA2 o CA3. La capa celular localizada inmediatamente por debajo del SP es el SO, lugar donde se localizan las dendritas basales de las neuronas piramidales, además del soma de una enorme variedad de interneuronas GABAérgicas, principalmente IN PV+ que inervan la región perisomática de las neuronas piramidales. La capa localizada inmediatamente superior al SP es el SR, lugar por donde viajan los axones provenientes de la región CA3, genéricamente denominados colaterales de Schaffer. La sinapsis que establecen las colaterales de Schaffer con las dendritas apicales proximales de las neuronas piramidales constituye la principal entrada excitadora que recibe la región CA1. Sin embargo, a la altura de las dendritas apicales más distales también se establece otra sinapsis excitadora fundamental

para las funciones de la región CA1, la sinapsis temporoamónica, cuyos axones provienen de la corteza entorrinal (Remondes & Schuman, 2004).

Morfología de las neuronas piramidales de CA1

El complejo árbol dendrítico de las neuronas piramidales emerge del soma y se divide en dos grandes dominios. El primer dominio lo comprenden las dendritas basales localizadas en el SO, mientras que el dominio apical corresponde a las dendritas apicales que se extienden desde el SR (dendritas apicales proximales) hasta el SL-M (dendritas apicales distales). Una característica que comparten las neuronas piramidales con otras neuronas hipocampales es la presencia de espinas a lo largo de todo el árbol dendrítico. Las espinas dendríticas son el sitio especializado en la recepción de información a través de sinapsis químicas, particularmente de naturaleza excitadora (Nimchinsky et al., 2002). Las neuronas piramidales están recubiertas por un aproximado de 30, 000 espinas dendríticas, encontrándose la mayor densidad de estas en los dominios basal y apical proximal (Megías et al., 2001; Irie & Yamaguchi, 2004). De hecho, mediante microscopía de alta resolución se ha observado que las dendritas más cercanas al soma están casi por completo recubiertas de espinas. Con respecto al axón, es una sola fibra que emana del soma y proyecta a lo largo del SO y el alveus. A pesar de que las neuronas piramidales poseen solamente un axón, este arboriza abundantemente, formando colaterales que contactan a diversos blancos, tanto dentro como fuera del hipocampo. En ese sentido, el blanco postsináptico más relevante de las neuronas piramidales de CA1 es el subículo. Un ejemplo de una reconstrucción morfológica, así como los principales contactos sinápticos de una neurona piramidal de CA1 de un ratón adulto es presentada en la figura 3.

Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de CA1

La fisiología celular de las neuronas piramidales ha sido estudiada con profundo detalle (Borde et al., 1995; Routh et al., 2009; Milior et al., 2016). Estas neuronas expresan un gran repertorio de conductancias iónicas que dan forma a su

excitabilidad intrínseca. Por ejemplo, poseen corrientes de K^+ que son activadas a potenciales supraumbrales, como aquellas conductancias dependientes de calcio que contribuyen a la hiperpolarización postpotencial (BK, SK, etc.) (Gu et al., 2007). Así mismo, poseen otras corrientes de K^+ que se activan a potenciales subumbrales, y que modulan la frecuencia de disparo, tal como las corrientes tipo A y D (I_A e I_D) (Storm, 1990; Johnston et al., 2000; Griego et al., 2022). Estos canales son de suma importancia para la fisiología de las neuronas piramidales, ya que ejercen una enorme influencia, no solo en la configuración de su excitabilidad intrínseca, sino también en sus capacidades computacionales a nivel dendrítico y somático, como se discutirá más adelante (Johnston et al., 2003).

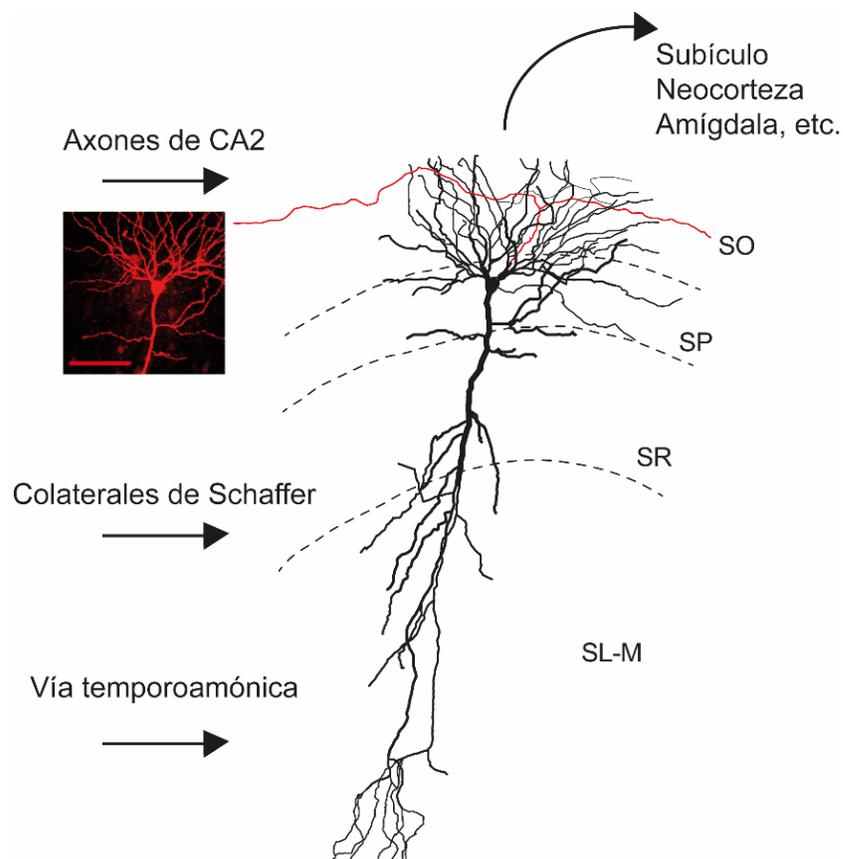


Figura 3 Morfología y principales conexiones sinápticas de las neuronas piramidales de CA1. Imagen confocal representativa de una neurona piramidal inyectada con biocitina durante registro electrofisiológico y su respectiva reconstrucción digital. En negro se muestran soma y dendritas, mientras que el axón se representa en color rojo.

1.4. Fisiología y biofísica de la integración sináptica

Una legítima comprensión de la fisiología neural implica el estudio de la capacidad de las neuronas para integrar y responder a la información sináptica que recibe. Este fenómeno computacional es conocido como integración sináptica (Gulledge et al., 2005). Podemos dividir el fenómeno general de la integración sináptica en dos procesos claramente diferenciables. El primero toma lugar a nivel dendrítico, donde las entradas sinápticas se suman en función de distintas variables tanto intrínsecas como extrínsecas a la neurona postsináptica, y se denomina integración dendrítica. Existen dos elementos de sumación básicos involucrados en la integración dendrítica: la sumación temporal (la suma de entradas sinápticas unitarias no simultáneas en el tiempo) y la sumación espacial (la adición de eventos sinápticos simultáneos que ocurren en regiones espacialmente separadas). Ambos tipos de sumación confieren operaciones computacionales fundamentales a las neuronas de un circuito determinado. Una vez que la información sináptica es procesada en los compartimentos dendríticos, las señales sinápticas viajan al soma y al segmento inicial del axón donde son computadas para determinar si se genera o no un potencial de acción. Si el resultado de la integración de la información sináptica da lugar o no a la generación de un potencial de acción, depende de tres variables fundamentales: a) la geometría dendrítica y la localización de las entradas sinápticas excitadoras en dominios específicos del árbol dendrítico, b) las propiedades pasivas o de cable y c) las propiedades activas de la membrana neuronal (Magee, 2000; Fuenzalida et al., 2007; Spruston, 2008). Esto es, el resultado final de la integración sináptica sobre la información que una neurona recibe depende tanto de la geometría como de las propiedades biofísicas intrínsecas de dicha neurona. Adicionalmente, la inhibición GABAérgica de los circuitos locales también influye notablemente en la integración neuronal (Häusser & Clark, 1997; Pouille & Scanziani, 2001).

1.4.1. Geometría dendrítica y biofísica neuronal

Las neuronas piramidales de CA1 poseen un árbol dendrítico extenso y altamente complejo, especializado en la recepción de información sináptica, tanto de naturaleza excitadora como inhibitoria. Además de su complejidad estructural, las dendritas son estructuras con una enorme complejidad funcional al poseer una gran variedad de receptores y canales iónicos distribuidos de una manera altamente específica según el tipo neuronal. La integración sináptica implica un proceso de filtrado de la información, proceso que es determinado por las propiedades geométricas y eléctricas de las dendritas. A mediados del siglo XX, Wilfrid Rall desarrolló una teoría matemática, denominada “teoría de cable”, que ha servido como marco de referencia para estudiar y comprender el filtrado dendrítico (Rall, 1969). De acuerdo con la teoría de cable, la amplitud de una corriente postsináptica excitadora (EPSC) que se propaga a lo largo de las dendritas es influenciada por variables físicas (resistencia y capacitancia membranal, resistencia axial, etc.) y por la propia geometría dendrítica. Adicionalmente, los efectos de estas variables electrotónicas dependen de la localización del contacto sináptico, siendo más poderosos sus efectos en las sinapsis más distales respecto del segmento inicial del axón, el sitio donde se generan los potenciales de acción (Magee, 2000). Lo anterior puede explicarse en parte, por las variaciones en la constante de tiempo membranal, la cual es dada por el producto de la resistencia por la capacitancia específica membranal, a lo largo del cableado dendrítico. Dado que la capacitancia específica membranal es esencialmente una constante biológica, variaciones en la constante de tiempo a lo largo del árbol dendrítico reflejan con alta probabilidad cambios en la resistencia debido a diferencias en el tipo y la densidad de canales iónicos expresados en la membrana dendrítica. Así, los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) provenientes de sinapsis distales sufrirán un filtrado más robusto, lo que generará EPSPs con menor amplitud y cinética más lenta.

En las neuronas piramidales de CA1, la atenuación sináptica ocurre principalmente en la región que existe entre el sitio de contacto sináptico y la dendrita apical primaria. Sin embargo, existe un filtraje adicional cuando el EPSP viaja entre la dendrita primaria y el soma, de tal manera que, teóricamente, un EPSP generado en una sinapsis distal debería llegar mucho más filtrado en términos de amplitud y forma al soma neuronal, con respecto a un EPSP generado en una sinapsis proximal. Este cambio en la cinética de los EPSPs debido al filtrado dendrítico tiene consecuencias directas sobre la sumación sináptica, prolongando la ventana temporal de integración, dentro de la cual los EPSPs más lentos provenientes de sinapsis más distales podrán sumarse. De esa manera, la integración dendrítica tiene dos efectos aparentemente contradictorios: producirá EPSPs de menor amplitud, pero al mismo tiempo prolongará la ventana temporal de integración, ya que se generarán EPSPs de cinética más lenta. Sin embargo, experimentos realizados utilizando liberación de glutamato enjaulado en diferentes dominios dendríticos mostraron que la amplitud de las corrientes evocadas es independiente del sitio de liberación del glutamato a lo largo del árbol dendrítico apical de las neuronas piramidales de CA1 (Pettit & Augustine, 2000). Otros experimentos, utilizando estimulación eléctrica en rebanadas de hipocampo, han demostrado que, a pesar de que algunas colaterales de Schaffer establecen sinapsis en dominios distales de las dendritas apicales, los EPSPs provenientes de estos sitios pueden tener suficiente amplitud y capacidad de sumación para evocar el disparo de las neuronas piramidales de CA1. Lo mismo ocurre con la sinapsis temporoamónica, en las dendritas más distales de las neuronas piramidales de CA1. Lo anterior sugiere que existen mecanismos que compensan la atenuación dendrítica, de tal forma que los EPSPs presentan una amplitud relativamente similar al llegar al soma neuronal, independientemente de la localización de la sinapsis de la que provengan. Un posible mecanismo involucrado es la propia geometría dendrítica, la cual afecta tanto la amplitud como la cinética de los EPSPs neuronales. Se ha demostrado, mediante estrategias experimentales y

simulaciones computacionales, que a mayor distancia del soma la resistencia de membrana local incrementa, mientras que la capacitancia local disminuye (Spruston et al., 1994; Chitwood et al., 1999). Lo anterior se debe probablemente a que el diámetro dendrítico disminuye progresivamente en las dendritas más distales. Sin embargo, otros mecanismos deben estar involucrados en la compensación del filtrado dendrítico, como es la presencia y apertura de canales iónicos dendríticos. De hecho, la presencia de conductancias iónicas a nivel dendrítico influye en las propiedades integrativas neuronales, tanto a nivel espacial como temporal: por ejemplo, corrientes catiónicas entrantes podrían brindar un soporte iónico que reemplace la pérdida de corriente sináptica durante el filtrado dendrítico (Scott et al., 2010; Lorincz & Nusser, 2010). Adicionalmente, y aunque corrientes catiónicas salientes altamente densas en las dendritas distales como las I_A e I_D , pueden tener un efecto sinérgico con el filtrado pasivo en las dendritas, se sabe que la despolarización que provoca la llegada de EPSPs puede tener un efecto inactivador en esas corrientes transitorias, conllevando a un incremento en la amplitud de los EPSPs provenientes de las sinapsis más distales (Johnston et al., 2000).

En resumen, la integración sináptica y el efecto de esta en la amplitud y cinética de las respuestas sinápticas que eventualmente llegarán al soma depende de la distribución de tipos específicos de canales iónicos a lo largo del árbol dendrítico, así como de las propiedades de cable y geometría neuronal.

1.4.2. Inhibición GABAérgica perisomática

A pesar de la enorme influencia que las propiedades morfofuncionales de las neuronas ejercen sobre la integración sináptica, hay otro factor crucial que define la generación o no del potencial de acción. La inhibición GABAérgica no solamente contrarresta los efectos despolarizantes de la excitación, sino que también es un factor crítico para la actividad en red de un circuito. En ese sentido, la inhibición GABAérgica perisomática tiene como una de sus funciones primordiales restringir

la sumación subumbral de la información sináptica al limitar la ventana temporal para la integración de las entradas excitadoras (Pouille & Scanziani, 2001a).

La circuitería hipocampal, incluyendo la de la región CA1, incorpora subcircuitos de inhibición proactiva que limita la duración de los EPSPs, generando un requerimiento de coincidencia temporal en las entradas sinápticas para la generación del potencial de acción. Así mismo, subcircuitos de inhibición por retroalimentación limitan la duración del disparo neuronal en respuesta a estímulos despolarizantes sostenidos (Pouille & Scanziani, 2004; Freund & Katona, 2007). En CA1, diferentes subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas inhiben a las neuronas piramidales innervando diferentes dominios somatodendríticos, siendo las interneuronas que más influencia tienen en la integración sináptica las que establecen sus sinapsis directamente en el soma de las neuronas piramidales. Lo anterior se debe a que la inhibición directamente en el soma ejercerá efectos similares para los EPSPs que lleguen de cualquier dominio dendrítico, mientras que la inhibición localizada en compartimentos dendríticos específicos tendrá efectos locales. Las dos principales interneuronas de innervación perisomática en CA1 son las IN PV+ e IN CCK+, ambas genéricamente clasificadas como células de canasta dada su relativa similitud morfológica, pero con claros matices en su fisiología celular (Freund & Katona, 2007).

En ese sentido, una gran diversidad de características fisiológicas y moleculares distinguen las terminales presinápticas de estos dos tipos de interneuronas y sus sinapsis con las neuronas piramidales de CA1. Una de las características que más llama la atención por su importancia fisiológica, así como por la utilidad experimental que representa, es la modulación presináptica diferencial a la que está sometida la inhibición de cada una de estas subpoblaciones. Mientras que las terminales axónicas de las IN PV+ expresan de manera selectiva receptores a opioides tipo μ , los botones presinápticos de las IN CCK+ expresan selectivamente receptores a endocannabinoides tipo CB1 (Tsou et al., 1999; Drake & Milner, 2002; Freund & Katona, 2007; Neu et al., 2007). Notablemente, ambos receptores

pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, particularmente a proteínas $G_{\alpha i}$, por lo que regulan negativamente el ingreso de calcio a la terminal presináptica limitando la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico, en este caso GABA. Esas particularidades funcionales pueden ser aprovechadas experimentalmente para evaluar el rol individual de cada una de estas dos subpoblaciones de interneuronas en la inhibición perisomática, y en consecuencia en la integración sináptica de las neuronas piramidales de CA1.

La figura 4 muestra un esquema simplificado de las características moleculares de la inhibición perisomática ejercida por IN PV+ e IN CCK+ sobre las neuronas piramidales de CA1.

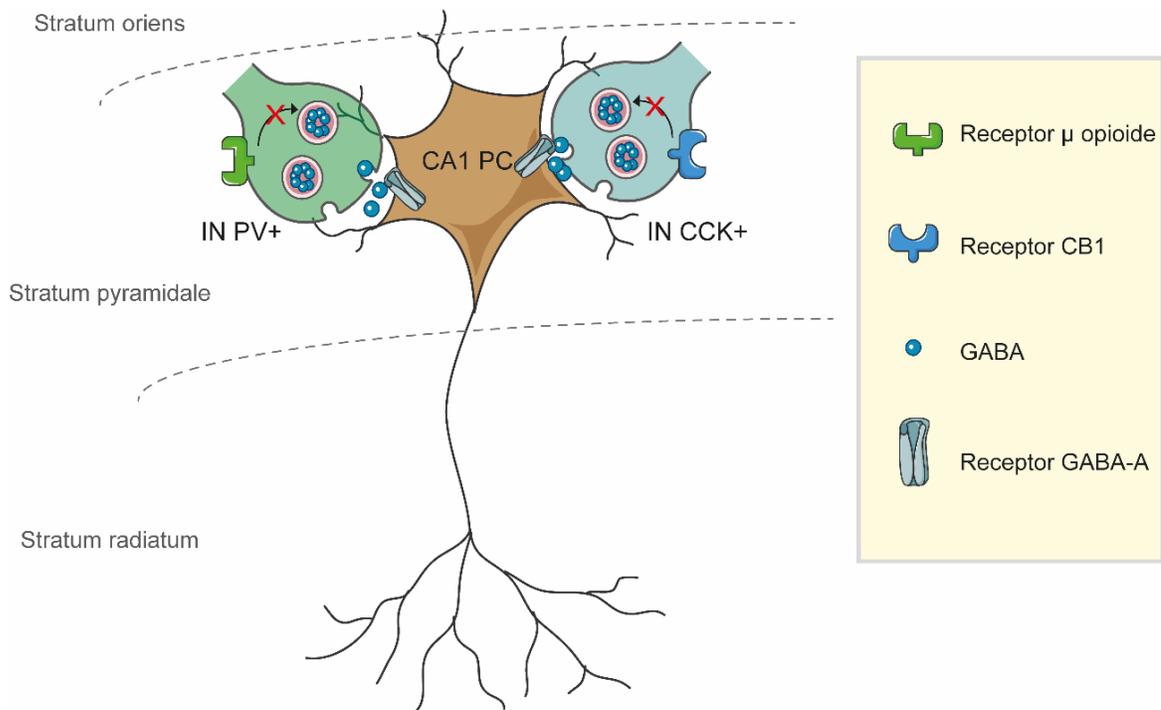


Figura 4 Inhibición perisomática complementaria sobre las neuronas piramidales de CA1. Esquema representando las dos principales fuentes de inhibición perisomática sobre las neuronas piramidales de CA1. Las IN PV+ expresan al receptor a opioides tipo μ , mientras que las IN CCK+ expresan al receptor CB1 en sus terminales presinápticas. Ambas subpoblaciones de interneuronas ejercen una influencia muy poderosa sobre la integración sináptica al contrarrestar la excitación proveniente de todos los dominios dendríticos de las neuronas piramidales de CA1.

La integración sináptica, tan trascendental como parece, no es solo un fenómeno abstracto de interés exclusivo para experimentadores del campo de la neurofisiología. De hecho, se ha teorizado, y desde algunas ópticas demostrado, que la integración sináptica juega un rol esencial en las funciones superiores del hipocampo, y de todo el cerebro. Por ejemplo, las operaciones computacionales que constituyen a la integración sináptica en su totalidad son la fuente primaria de información usada por la neocorteza e hipocampo para la codificación de las funciones cognitivas superiores, como lo son, la memoria y el aprendizaje (Garden et al., 2008). En ese sentido, si las variables neurofisiológicas de las que depende la integración sináptica y el adecuado procesamiento computacional de la información están alteradas, es de suponer que la propia integración sináptica también lo estará. En consecuencia, las funciones cognitivas también podrían estar comprometidas.

En años recientes, mucho se ha estudiado acerca de las alteraciones anatómicas, neuroquímicas y moleculares en los trastornos neuropsiquiátricos asociados a la MIA. Sin embargo, quedan por ser exploradas, en términos cuantitativos, las perturbaciones inducidas por la MIA en las variables neurofisiológicas de las que dependen las propiedades computaciones neuronales. En este trabajo realizamos un acercamiento experimental que tiene como objetivo primario determinar las modificaciones en la morfología dendrítica, las propiedades electrofisiológicas pasivas y activas, la inhibición GABAérgica y la integración sináptica inducidas por un modelo bacteriano de inflamación materno-fetal.

2. Justificación

La MIA es un factor de riesgo para el desarrollo trastornos neuropsiquiátricos asociados a anomalías en el neurodesarrollo, como la esquizofrenia. Sin embargo, no se ha investigado si la activación inmune durante el neurodesarrollo modifica las variables neurofisiológicas que configuran a la integración sináptica en el hipocampo.

3. Hipótesis

La MIA modificará la geometría y la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1, al mismo tiempo que atenuará la inhibición GABAérgica perisomática. En consecuencia, alterará los componentes espaciales y temporales de la integración sináptica en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo de la descendencia.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Demostrar, mediante técnicas electrofisiológicas, anatómicas y moleculares, que la MIA altera la morfología, excitabilidad intrínseca e inhibición GABAérgica, así como y las propiedades computacionales de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.

4.2. Objetivos específicos

- I. Validar un modelo de MIA en ratones de la cepa C57BLACK6, mediante la administración intraperitoneal de LPS.
- II. Determinar si la MIA altera la sumación temporal y espacial en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.
- III. Determinar el efecto de la MIA en la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.
- IV. Determinar el efecto de la MIA en la morfología y complejidad dendrítica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.

- V. Analizar si la activación inmune materna modifica la inhibición GABAérgica perisomática sobre las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia y determinar su influencia en la integración sináptica.

5. Metodología

5.1. Animales y diseño experimental

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del Cinvestav (CICUAL-0063-13), y fueron llevados a cabo bajo estricto apego a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (MON-062-ZOO-1999). Nuestros procedimientos también siguieron los lineamientos dictados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América.

Fueron utilizados ratones de la cepa C57BLACK/6. Hembras de entre 12 y 14 semanas en fase de proestro/estro fueron mantenidas durante una noche con machos sexualmente expertos, para que copularan. La fase del ciclo estral, así como la confirmación de la cópula hasta la eyaculación fueron corroboradas mediante frotis vaginal. En el día gestacional 15 (GD15), a las ratonas embarazadas les fue administrada una dosis de LPS obtenido de *Escherichia coli* del serotipo O26:B6 (500 µg/kg, vía intraperitoneal), o bien, de solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.9%). El volumen administrado fue ajustado según la masa corporal de los animales (1 mL/Kg). A partir del GD15, cada ratona fue dejada en una caja individual debidamente acondicionada y se mantuvo ahí hasta el nacimiento de las crías. El estado general de salud de las crías fue evaluado evitando el contacto físico con ellas, y fueron dejadas con sus madres hasta el día postnatal 21 (PD21), momento en el cual fueron transferidas en cajas con 4-6 ratones en cada una hasta su uso experimental. En todos los experimentos se utilizaron únicamente crías macho de 32±4 días de vida postnatal. Los animales empleados en este estudio fueron mantenidos en el bioterio institucional bajo condiciones ambientales controladas, incluyendo un ciclo luz-oscuridad de 12:12 h, temperatura ajustada a 23 ± 1°C y agua y alimento *ad libitum*. Diariamente, los animales fueron supervisados con el fin de asegurar que estuvieran saludables y en condiciones óptimas de limpieza.

A partir de este punto los ratones cuyas madres fueron tratadas con LPS se denominarán ratones MIA y las crías de ratonas tratadas con SSI, se denominarán ratones control.

5.2. Medición de la temperatura corporal

La temperatura corporal de las ratonas administradas con LPS o SSI fue monitoreada inmediatamente antes de la inyección ($t = 0$) y durante las 3 horas posteriores, en intervalos de tiempo de 30 minutos ($t = 30, 60, 90, 120, 150$ y 180) para registrar evidencia que indicara un proceso febril. Para ello se utilizó un sistema de termometría infrarroja (FR-1DM1, Microlife, FL, USA), como previamente se ha reportado (Kawakami et al., 2018).

5.3. Determinación de niveles séricos de citocinas por ELISA

Muestras sanguíneas (≈ 0.5 mL) de ratonas embarazadas fueron obtenidas 1 h después de ser administradas con LPS o SSI. El suero fue obtenido mediante la centrifugación de las muestras de sangre ($5000 \times g$, 5 minutos) para remover el paquete celular. Las concentraciones séricas de TNF- α e IL-6 fueron determinadas usando kits de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) específicamente diseñados para cada citocina (PeproTech, Cranbury, NJ, USA), siguiendo las instrucciones de los proveedores. Para cada ensayo, una curva estándar fue construida, y las absorbancias obtenidas fueron graficadas y ajustadas a una función polinómica de primer orden de la forma:

$$f(x) = mx + b,$$

con la cual se calcularon las concentraciones de las citocinas evaluadas (pg/mL).

5.4. Electrofisiología

Obtención de rebanadas de cerebro

Ratones macho de 32 ± 4 días de vida postnatal fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg, vía intraperitoneal) e inmediatamente después decapitados. Los cerebros fueron gentilmente removidos

del cráneo y colocados en una solución helada a base de sacarosa con la siguiente composición (mM): 210 sacarosa, 2.8 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 Na₂HPO₄, 25 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, y 10 D-glucosa, saturada con una mezcla de carbógeno (95% O₂/5% CO₂). El método para la obtención de rebanadas sagitales de cerebro que incluyan a la formación hipocampal ha sido detallado por nuestro laboratorio en publicaciones previas (Herrera-López & Galván, 2018; Griego et al., 2021). Las rebanadas (350 µm) se mantuvieron a 34°C por 30 minutos sumergidas en líquido cerebroespinal artificial (aCSF) con la siguiente composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na₂HPO₄, 25 NaHCO₃, 4 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D- glucosa, pH = 7.2. Después, las rebanadas fueron mantenidas a temperatura ambiente en la misma solución por al menos 60 minutos antes de cualquier manipulación experimental. Cada rebanada fue transferida a una cámara de registro de sumersión de 350 µL y perfundida con aCSF con la siguiente composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na₂HPO₄, 25 NaHCO₃, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 D- glucosa, pH = 7.2, y una osmolaridad de 280-290 mOsm. Constantemente, el aCSF fue saturado con la mezcla de carbógeno. Todos los registros electrofisiológicos fueron realizados a una temperatura de 32 ± 1°C con la ayuda de un controlador de temperatura de canal único (TC-324C, Warner Instruments, Hamden, CT, USA).

A fin de minimizar desviaciones estadísticas, se utilizó un máximo de tres rebanadas por ratón.

Registros electrofisiológicos de patch-clamp

Rebanadas dorsales de la formación hipocampal fueron visualizadas con un sistema óptico infrarrojo de contraste de interferencia diferencial (IR-DIC) acoplado a un microscopio Nikon FN1. Las neuronas piramidales de CA1 fueron identificadas en función de su ubicación somática, forma y tamaño. Las pipetas de registro fueron fabricadas al momento de su uso a partir de capilares de borosilicato, utilizando un estirador de micropipetas (Modelo P97, de Sutter Instruments), y tuvieron una resistencia final de 4 – 6 MΩ al ser llenadas con una solución

intracelular con la siguiente composición (mM): 135 gluconato de K⁺, 10 KCl, 5 NaCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg²⁺-ATP, 0.4 Na⁺-GTP, 10 fosfocreatina, y pH = 7.2 – 7.28. De manera rutinaria, se añadió biocitina al 0.4 % en la solución intracelular con la finalidad de tener un marcador intracelular e identificar *post-hoc* sus características morfológicas y realizar una reconstrucción neuronal y análisis morfométrico. Los registros electrofisiológicos fueron realizados en la configuración de célula completa mediante la técnica de patch-clamp, tanto en la modalidad de fijación de corriente (I_{clamp}) como en fijación de voltaje (V_{clamp}). Los registros se realizaron usando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), y las señales fueron digitalizadas, muestreadas (10 kHz) y filtradas (5 kHz) mediante una Digidata 1322A (Axon Instruments). Las señales digitales fueron adquiridas y analizadas mediante el software pCLAMP11.2 (Molecular Devices).

Análisis de la excitabilidad intrínseca neuronal

Una vez que el potencial de membrana en reposo (RMP) se estabilizó en la modalidad de V_{clamp} , la modalidad fue cambiada a I_{clamp} , y una serie de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante fueron inyectados mediante la pipeta de registro (1 s, incrementos de 30 pA) desde -300 pA hasta la rheobase para la determinación de las propiedades intrínsecas membranales, incluida la resistencia de entrada (R_N), la constante de tiempo (τ_{memb}) y la corriente rheobase (I_{Rheo}) requerida para evocar al menos un potencial de acción (PA). La R_N fue calculada como la pendiente de una función polinómica de primer orden de la forma:

$$f(x) = mx + b,$$

ajustada a la porción lineal de la relación corriente-voltaje de las neuronas registradas, donde m es la R_N . La τ_{memb} se calculó ajustando una función exponencial de la forma:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} + C,$$

a una respuesta de voltaje generada por la inyección de un pulso de corriente hiperpolarizante (1 s, -30 pA), y donde τ_i es la τ_{memb} . Finalmente, la I_{Rheo} se determinó como la intensidad de corriente despolarizante requerida para generar al menos un PA.

Análisis de la frecuencia de disparo neuronal

Para analizar la frecuencia de disparo ($f_{(I)}$) de las neuronas piramidales de CA1 registradas, fueron construidas curvas de corriente-frecuencia. Para ello, la $f_{(I)}$ fue graficada con respecto de la intensidad de corriente inyectada. A la curva resultante le fue ajustada una ecuación sigmoideal de 3 parámetros de la forma:

$$f_{(I)} = a / (1 + e^{-k(I-I_0)}),$$

donde $f_{(I)}$ es la frecuencia de disparo en función de la corriente inyectada, y k es la ganancia.

Análisis de la dinámica del potencial de acción

El análisis dinámico del PA se realizó construyendo diagramas de fase, los cuales representan la evolución dinámica del PA a lo largo del tiempo. Para ello la ecuación diferencial dV/dt ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) se grafica con respecto al potencial de membrana. El bucle resultante fue usado para determinar el umbral (V_{th}), la amplitud, la duración y las velocidades máximas de despolarización (VMD) y repolarización (VMR) del PA.

Análisis biofísico de las corrientes de K^+ tipo A (I_{KA})

El análisis de las corrientes de K^+ se llevó a cabo siguiendo protocolos previamente reportados por nuestro laboratorio (Griego et al., 2022). Para aislar la I_{KA} , las pipetas de registro fueron llenadas con una solución intracelular con la siguiente composición: 135 gluconato de K^+ , 10 KCl, 5 NaCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg^{2+} -ATP, 0.4 Na^+ -GTP, and 10 fosfocreatina. Para bloquear las corrientes de sodio de rápida inactivación, tetrodotoxina (TTX, 0.5 μM) fue añadida al aCSF. Fue utilizado

un protocolo farmacológico para disociar la I_{KA} de la corriente total de K^+ (I_{Ktotal}), para lo cual 4-aminopiridina (4-AP, 50 μ M) y tetraetilamonio (TEA, 5 mM) fueron incluidos en el aCSF a fin de bloquear las corrientes de K^+ tipo D (I_{KD}) y las corrientes de K^+ de rectificación retardada, respectivamente.

La relación voltaje-corriente (V-I) de la I_{KA} fue determinada manteniendo a el potencial de membrana fijado a -70 mV, para después aplicar comandos de voltaje de 500 ms desde -90 mV hasta +50 mV en incrementos de 20 mV. Para determinar la activación dependiente del voltaje de la I_{KA} , las conductancias (G) fueron calculadas en cada comando de voltaje (V), de acuerdo con la ecuación:

$$G = I/(V - V_{rev}),$$

donde V_{rev} es el potencial de equilibrio del potasio. Las conductancias obtenidas fueron normalizadas (G/G_{max}), y graficadas respecto a sus correspondientes comandos de voltaje. A esos datos fue ajustada una función de Boltzmann de la forma:

$$G/G_{max} = 1/1 + e^{[(V-V_{1/2})/k]},$$

donde $V_{1/2}$ es el voltaje requerido para alcanzar la mitad de la máxima activación y k es un factor algebraico que denota el grado de dependencia al voltaje de la activación de la I_{KA} .

Para analizar la inactivación dependiente del voltaje de la I_{KA} , se aplicaron comandos de voltaje para llevar el potencial de membrana desde el potencial de mantenimiento (-70 mV) hasta +50 mV, precedidos por comandos de pre-acondicionamiento de 50 ms desde -90 mV hasta +50 mV en incrementos de 10 mV, diseñados para activar la I_{KA} previo al comando de prueba con el cual se analiza la inactivación de la corriente. Las amplitudes de las corrientes fueron normalizadas (I/I_{max}) fueron graficadas respecto a los pulsos de pre-acondicionamiento y a esos datos les fue ajustada una función de Boltzmann de la forma:

$$I/I_{\max} = I_{\max} + (I_{\max} - I_{\min}) \left(\frac{1}{1 + e^{[(V-V_{1/2})/k]}} \right),$$

donde $V_{1/2}$ es el voltaje requerido para alcanzar la mitad de la inactivación máxima y k es un factor algebraico que denota el grado de dependencia al voltaje de la inactivación de la I_{KA} .

Finalmente, la recuperación de la I_{KA} del estado inactivado fue evaluada mediante la aplicación de dos comandos de voltaje idénticos (80 ms de duración, de -60 a +80 mV). El primer comando fue aplicado con el fin de inactivar a la I_{KA} . Entre el primer comando y el segundo se dejó un intervalo de tiempo creciente desde 20 ms hasta 500 ms en incrementos de 20 ms, a fin de evaluar la dependencia temporal de la recuperación del estado inactivado. Las amplitudes fueron normalizadas (I/I_{\max}) y graficadas respecto al intervalo de tiempo correspondiente al que se aplicó el segundo comando de voltaje. Los datos fueron ajustados con una función de asociación exponencial monofásica de la forma:

$$I/I_{\max} = -A (1 - e^{-\Delta t/\tau}),$$

de donde se pudo calcular $t_{1/2rec}$, que es el tiempo al que se alcanza la mitad de la recuperación de la inactivación de la I_{KA} . Todos los ajustes empleados alcanzaron un coeficiente de determinación $r^2 > 0.90$.

Análisis de la actividad sináptica espontánea

Las corrientes postsinápticas excitadoras e inhibitoras espontáneas (sEPSCs e sIPSCs, respectivamente) fueron registradas en la modalidad de V_{clamp} , manteniendo el potencial de membrana fijo a -70 mV para las sEPSCs y a 0 mV para las sIPSCs. Las sIPSCs fueron registrados en presencia de D-APV (50 μ M) para bloquear la transmisión dependiente de receptores a glutamato tipo NMDA. Al final de cada experimento, el antagonista de receptores GABA_A bicuculina (10 μ M) fue perfundido para corroborar la naturaleza GABAérgica de las sIPSCs. Se analizaron los cambios en la frecuencia, la amplitud y la cinética de las corrientes espontáneas entre ambas condiciones. La cinética de las corrientes fue

determinada midiendo el tiempo de subida y de decaimiento (t_{sub} y t_{dec}) entre el 10-90% de la amplitud de los eventos promediados de una célula.

Análisis de la inhibición GABAérgica perisomática

A fin de registrar IPSCs provenientes de los circuitos de inhibición locales en las neuronas piramidales de CA1, se colocó un electrodo bipolar en el SR de CA1 (~100 μm del SP) con el cual se estimuló eléctricamente a una frecuencia de estimulación de 0.1 Hz. El potencial de membrana fue fijado a 0 mV a fin de obtener corrientes salientes, las cuales se aislaron farmacológicamente mediante la adición al aCSF de D-APV (50 μM). Usando un enfoque farmacológico, se analizó la participación complementaria de las dos principales clases de interneuronas de inhibición perisomática. Para ello se tomó ventaja de la expresión selectiva de los receptores a opioides tipo μ y a endocannabinoides tipo CB1 en las IN PV+ y CCK+, respectivamente (Heifets et al., 2008; A. F. Hoffman & Lupica, 2000; Krook-Magnuson et al., 2011; Monday et al., 2020; Shao et al., 2020). La amplitud de las IPSCs fue normalizada y graficada con respecto al tiempo, según se describe a continuación: 5 minutos de actividad basal, seguida de 5 minutos en presencia del agonista μ opioide (DAMGO, 2 μM) o CB1 (WIN 55, 212-2, 2 μM) y finalmente, 5 minutos en presencia de bicuculina (10 μM) o picrotoxina (50 μM). El porcentaje de inhibición dependiente de IN PV+ e IN CCK+ se calculó como el porcentaje de disminución de la amplitud de las IPSCs en presencia sea de DAMGO o de WIN 55, 212-2 con respecto a la amplitud basal.

Análisis de la integración sináptica

Sumación temporal

El análisis de la sumación temporal se realizó en la modalidad de I_{clamp} , para lo cual las neuronas se mantuvieron a un potencial de membrana de ~ -70 mV. Mediante un electrodo extracelular localizado en el SR de CA1 (~100 μm del SP), se estimularon las colaterales de Schaffer para generar trenes de 10 EPSPs a

frecuencias de 20 Hz y 50 Hz. Se midió la amplitud de los EPSPs de cada tren, y el porcentaje de sumación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de sumación} = \left(\frac{EPSP_{10} - EPSP_1}{EPSP_1} \right) \times 100.$$

En algunos experimentos, el registro de los trenes de EPSPs se realizó en presencia de ZD-7288 (20 μM) o PTX (50 μM o 100 μM).

Sumación espacial

Para analizar la sumación espacial, se colocaron dos electrodos extracelulares en el SR de CA1, localizados a $\sim 100 \mu\text{m}$ y $\sim 300 \mu\text{m}$ de SP, a fin de evocar EPSPs provenientes de diferentes axones de las colaterales de Schaffer. Se estimuló a intervalos (Δt) desde 0 ms hasta 40 ms, y viceversa, en intervalos de 5 ms entre el primer y segundo estímulo. Por cada Δt se realizaron 10 pruebas y se cuantificó la probabilidad de generar un PA en los diferentes Δt . Las probabilidades de generación de un PA se normalizaron y los datos se ajustaron a una función de densidad de probabilidad continua de Lorentz de la forma:

$$P_{(\Delta t)} = \frac{P_{max}}{1 + \left(\frac{x_i - x_0}{\gamma} \right)^2}$$

donde $P_{(\Delta t)}$ es la probabilidad de generar un potencial de acción, P_{max} es la amplitud del centro de la distribución y γ es un parámetro de escala que especifica el ancho medio de la distribución. El ancho de la curva nos brindó una medida de la resolución de la ventana de integración (esta medida no es idéntica a la desviación estándar que se obtendría con un ajuste Gaussiano, como el usado por (Pouille & Scanziani, 2001), pero tiene el mismo significado estadístico en general).

En algunos experimentos, la ventana de sumación espacial se realizó en presencia de PTX (50 μM o 100 μM).

5.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Obtención de rebanadas coronales

El procedimiento de obtención de rebanadas y de Inmunodetección de GAD-67 fue realizado como previamente se ha reportado por nuestro laboratorio (Villanueva-Castillo et al., 2017; Griego et al., 2021). Brevemente, tres ratones macho de cada condición fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg, vía intraperitoneal). Inmediatamente después fueron perfundidos intracardiamente con solución salina isotónica (NaCl, 0.9%) seguida de PFA al 4 % en buffer de fosfato en buffer de fosfato (PB; pH 7.4). Después, los animales fueron decapitados y cada cerebro fue removido cuidadosamente y fijados en la misma solución de PFA al 4% por 24 horas a 4°C. Los cerebros fueron crioprotectados por inmersión en soluciones de sacarosa de concentración creciente (20% y 30%), por al menos 24 horas. Después, los cerebros fueron congelados, usando 4-metilbutano previamente enfriado, y almacenados a -70°C hasta su seccionamiento. Se obtuvieron secciones coronales de 30 µm con ayuda de un criostato (bregma -1.22 a -3.28 aproximadamente) y colectadas en placas de cultivo de 30 pozos donde se mantuvieron sumergidas en solución crioprotectora (etilenglicol 25%, glicerol 25% y PB 50%). Las rebanadas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Inmunodetección de GAD-67

Las rebanadas fueron lavadas con PBS (4 ×10 min) y posteriormente incubadas en una solución de PBS con albúmina sérica bovina (BSA 3%) y Tritón X-100 0.3% durante 2 horas. Posteriormente, las rebanadas fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiental en presencia del anticuerpo primario Anti-GAD67 (mouse; 1:500; AB_2278725; Merck Millipore, MA, USA), diluido en una solución de PBS con BSA (1%) y Tritón X-100 (0.2%). Las rebanadas se lavaron con PBS (4 ×10 min) y posteriormente se incubaron en presencia del anticuerpo secundario anti-mouse Cy5 (policlonal; 1:250; AB_87836; Thermo Fisher, MA, USA) durante 2

horas. Antes de los ensayos, fue llevado a cabo un proceso de titulación a fin de establecer la mejor dilución empleada para cada anticuerpo (Hoffman et al., 2016). Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, las secciones se lavaron con PBS (4 ×10 min) y se montaron usando Vectashield vibrance medium (Vector Laboratories; H-1800). La adquisición de imágenes se realizó mediante un microscopio confocal (LSM 800 con Airyscan; Carl Zeiss, Alemania). El análisis cuantitativo de las adquisiciones se realizó utilizando el software ImageJ (NIH Image, USA).

Inmunodetección de GFAP y CD-11b

El procedimiento fue similar al descrito en la sección previa. Sin embargo, los anticuerpos usados fueron los siguientes: Anti-GFAP (Goat; 1:500; AB_880202; Abcam, Cambridge, UK), Anti-CD-11b (Rabbit; 1:500; AB_2889154; Abcam); Anti-goat Alexa-488 (Donkey; 1:500; AB_2534102; Thermo Fisher MA, USA; Anti-rabbit Alexa-488 (Donkey; 1:500; AB_2535792; Thermo Fisher). La adquisición de imágenes se realizó mediante un microscopio confocal (LSM 800 con Airyscan; Carl Zeiss, Alemania). El análisis cuantitativo consistió en el conteo de células GFAP o CD-11b positivas por campo (640 × 640 μm).

Reconstrucción de neuronas marcadas con biocitina

La solución intracelular con biocitina (0.4%) fue preparada diariamente. Las rebanadas con neuronas marcadas con biocitina fueron fijadas en PFA al 4% toda la noche a 4°C. Posteriormente, el PFA fue sustituido por PBS por otras 24 horas a 4°C. Las rebanadas fueron lavadas con PBS (4 ×10 min) y posteriormente se incubaron en una solución de PBS con albúmina sérica bovina (BSA 3%) y Tritón X-100 0.3% durante 2 horas. Después, las rebanadas fueron incubadas con estreptavidina acoplada con el fluoróforo Texas Red (1:500; Vector Laboratories; SA-5006) durante al menos 5 horas a temperatura ambiental. Finalmente, las secciones fueron lavadas con PBS (4 ×10 min) y montadas usando Vectashield Vibrance Medium, y analizadas usando un microscopio confocal (LSM 800, Zeiss).

La longitud de onda empleada para excitar al fluoróforo fue de 561 nm. Una pila de imágenes (z-stack) fue obtenido usando el software Zen 2.3 (Carl Zeiss, Alemania), con la cual se realizó la reconstrucción digital de cada neurona marcada con biocitina usando el software ImageJ (NIH Image, USA).

5.6. Análisis morfométrico neuronal

Para determinar la complejidad dendrítica se utilizó el análisis de Sholl con ayuda del plugin SNT (simple neurite tracer) para ImageJ (NIH Image, USA). En este análisis, círculos concéntricos son dibujados desde el soma cada 10 μm , y el número de intersecciones entre los círculos y el árbol dendrítico es cuantificado. Usando este mismo análisis fueron determinados el radio crítico (r_c), el número máximo de intersecciones (N_{max}) y la longitud dendrítica total. El área bajo la curva (AUC) fue calculado mediante la regla del trapecioide de tal forma que:

$$AUC = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \sum_{i=1}^N f_i(x) \Delta x,$$

Donde N es el número de trapecoides, Δx es el ancho de cada trapecioide, y donde la sumatoria se convierte en la integral de la forma:

$$\int_a^b f(x) dx,$$

cuando $\Delta x \rightarrow 0$ y $N \rightarrow \infty$, cuya inmediata aplicación indica el área bajo la gráfica donde $f(x)$ es el número de intersecciones. La complejidad dendrítica (DCI) fue determinada como previamente se ha reportado (Valle-Bautista et al., 2020), aplicando la siguiente ecuación:

$$DCI = \left(\frac{\sum \text{branch tip orders} + \# \text{ of branch tips}}{(\# \text{ of primary dendrites})(\text{total dendritic length})} \right).$$

5.7. Análisis de la transcripción de citocinas por RT-qPCR

Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

La región hipocampal de ratones control o MIA fue lisado utilizando 1 mL de TRIzol (Sigma-Aldrich). Posteriormente se aisló el ARN utilizando el método de extracción fenol-cloroformo y siguiendo las instrucciones incluidas en cada reactivo. El ARN extraído se resuspendió en 7 mL de una solución de RNA Secure. La calidad y cantidad del ARN fue determinada mediante electroforesis de un gel de agarosa y por análisis espectrofotométrico (NanoDrop). De ese modo se determinó la concentración y el coeficiente 260/280 del ARN de cada muestra. Para la síntesis del ADNc se utilizó el KIT RevertAid First Strand cDNA Synthesis. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo utilizando 2 µg de ARN y las siguientes condiciones de termociclado: 5 minutos a 60°C, 1 hora a 42°C y 10 minutos a 70°C.

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Se analizaron los niveles de expresión de genes de citocinas proinflamatorias en ratones control y MIA mediante RT-qPCR. Para ello, fueron empleados oligonucleótidos iniciadores específicos para TNF- α , IL-1 β e IL-6. Como control, fue utilizada la expresión de el gen de la enzima de expresión constitutiva gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias de los oligonucleótidos pueden consultarse en la tabla 1. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado, utilizando 150 ng de ADNc (3 µL), 0.3 µM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) y 5 µL de Maxima SYBR Green/ROX q-PCR Master Mix 2X, en un volumen final de 10 µL. Las muestras se amplificaron utilizando el termociclador PikoReal Real-Time PCR System 96 y las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y finalmente 60 °C por 45 segundos. Se utilizó un paso adicional con un rango de temperatura de 65-95°C para generar una curva de disociación (curva Melt), la cual permitió verificar la generación de un solo amplicón para cada par de oligonucleótidos.

Para determinar el número de ciclos en que la fluorescencia comienza a ser detectada (Cq) se utilizó el Software PikoReal V 2.2. El valor de Cq fue usado para calcular la expresión relativa de cada gen, mediante el método $2^{\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Nombre del gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
<i>tnf-α</i>	5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'	5'-GCCATAGAAGTGCATGAGAGGGAG-3'
<i>il6</i>	5'-TACCACTTCACAAGTCGGAGGC-3'	5'-CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC-3'
<i>gapdh</i>	5'-ATTGTGGAAGGGCTCATGAC-3'	5'-AGTGGATGCAGGGATGATGT-3'

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la RT-qPCR

6. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm error estándar de la media. Los gráficos de violín muestran la mediana, media, rango intercuartil y cada uno de los datos individuales que conforman la muestra. Todas las comparaciones estadísticas fueron realizadas entre la descendencia de ratonas inyectadas con SSI vs aquellas inyectadas con LPS. Los animales fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimentales a través de un proceso de muestreo aleatorio simple. La normalidad en la distribución de los datos experimentales se validó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($P = 0.05$). La comparabilidad entre las dos condiciones experimentales fue evaluada por Student's t-test de dos colas o por ANOVA de dos factores, según fuera apropiado. Cuando la F alcanzó un valor mínimo de significancia, se realizaron pruebas de comparación múltiple mediante la prueba de Holm-Šidák. La comparación estadística de las distribuciones de probabilidad acumulada de la actividad sináptica espontánea fue determinada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para todos los experimentos y comparaciones, los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$. Todos los ajustes matemáticos y pruebas estadísticas se realizaron con ayuda de los softwares Clampfit 11.2 (Molecular devices) y Graphpad Prism 8.

7. Resultados

7.1. La inyección de LPS en ratonas gestantes induce una respuesta inflamatoria sistémica y reduce el número de crías por camada

Ratonas preñadas de la cepa C57BL/6 recibieron una sola dosis intraperitoneal de LPS (500 µg/kg) en el GD15 (Fig. 5A). La temperatura corporal fue monitoreada, observándose un incremento en las ratonas tratadas con LPS con respecto a aquellas que recibieron SSI. No obstante, tal incremento no fue estadísticamente significativo (Fig. 5B). La desregulación térmica en las ratonas inyectadas con LPS estuvo acompañada de conductas sugerentes de malestar físico, como piloerección y disminución de la actividad motora, como ha sido reportado (Biesmans et al., 2016). Para verificar que tales conductas eran consecuencia de una respuesta inflamatoria sistémica inducida por la inyección de LPS, se procedió a cuantificar los niveles de séricos de TNF- α e IL-6. Ambas citocinas estuvieron elevadas en el suero de las ratonas que recibieron la dosis de LPS en comparación con las ratonas que recibieron SSI (TNF- α en control: 62.1 ± 5.83 pg/mL; en LPS: 820.2 ± 40.62 pg/mL; Student's t-test; $t_8=18.470$; $P < 0.001$; Fig. 5C. IL-6 en control: 86.1 ± 6.78 pg/mL; en LPS: 1310.1 ± 71.41 pg/mL; Student's t-test; $t_8=17.060$; $P < 0.001$; Fig. 5D). Adicionalmente, las ratonas inoculadas con LPS tuvieron camadas con un reducido número de crías en comparación con las ratonas control (número de crías por camada en control: 7.1 ± 0.52 ; en LPS: 4.3 ± 0.47 ; Student's t-test; $t_{18} = 3.960$; $P < 0.001$; $n = 11$ animales por cada condición; Fig. 5E). En conjunto, los datos previamente descritos indican que la administración sistémica de LPS a la dosis empleada induce una intensa activación inmune materna (MIA) en ratonas preñadas.

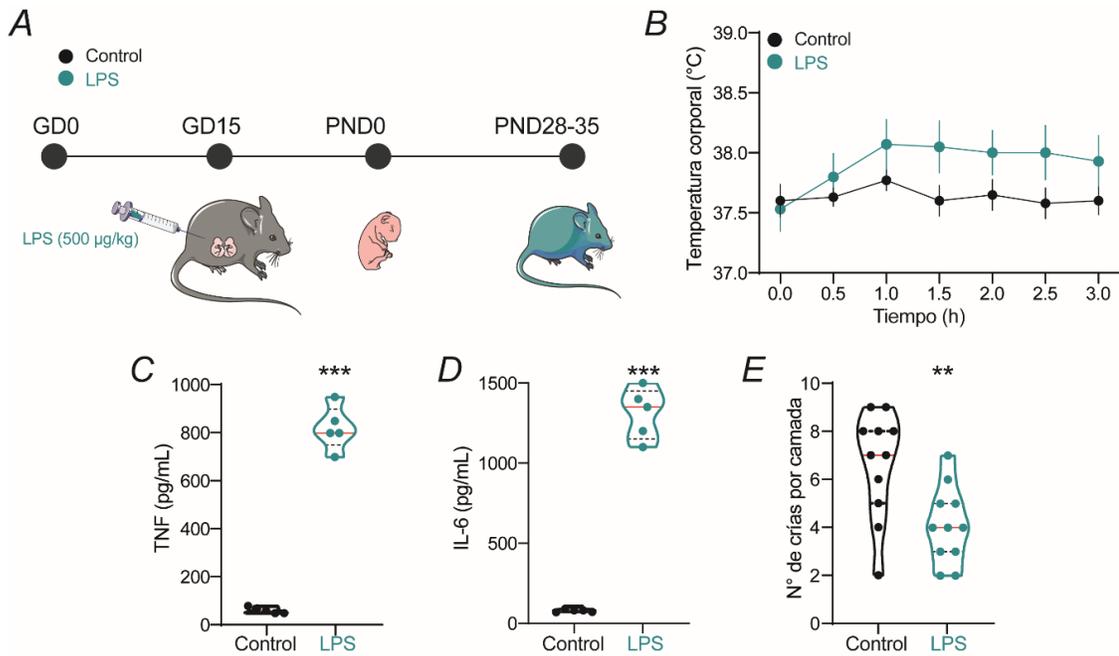


Figura 5 La administración sistémica de LPS induce MIA y disminuye el número de crías por camada. A) Esquema del diseño experimental para la inducción de la MIA. B) La inyección de LPS induce una discreta elevación de la temperatura corporal a partir de los 30 minutos de la administración. C-D) El LPS induce un marcado incremento en los niveles séricos de TNF- α y de IL-6, citocinas indicativas de un proceso inflamatorio sistémico. E) Además de la respuesta inflamatoria, la inyección de LPS reduce el número de crías por camada significativamente. La línea roja en los gráficos de violín representa la media aritmética, mientras que las líneas punteadas señalan el primer y tercer cuartil. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

7.2. La MIA incrementa la sumación temporal en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia

Ha sido ampliamente documentado que la MIA es un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos asociados a alteraciones en el neurodesarrollo (Knuesel et al., 2014). Sin embargo, poco ha sido descrito de los mecanismos neurofisiológicos implicados. En particular, no hay información respecto de cómo la MIA inducida por LPS o antígenos virales puede alterar las capacidades computacionales de las neuronas. Por tal razón, decidimos explorar si la MIA inducida por LPS modifica los componentes temporal y espacial de la integración sináptica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.

Para analizar la sumación temporal, se registraron trenes de 10 EPSPs evocados a 20 Hz y 50 Hz mediante la estimulación de las colaterales de Schaffer (Fig. 6A). A

20 Hz no se encontraron diferencias en la amplitud de los EPSPs a lo largo del tren (Fig. 6B) ni en el porcentaje de sumación (% de sumación en control: 69.37 ± 1.86 %; en MIA: 72.47 ± 1.63 ; Student's t-test; $t_{28} = 1.253$; $P = 0.221$; $n = 15$ células/8-10 animales por cada condición; Fig. 6C). En contraste, durante la estimulación a 50 Hz se observó una tendencia a que, a lo largo del tren, los EPSPs tuvieran una mayor amplitud (Fig. 6D). Lo anterior se acompañó de un importante incremento en la capacidad de sumación de los EPSPs en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA con respecto a los controles (% de sumación en control: 201.91 ± 5.61 %; en MIA: 312.62 ± 6.74 ; Student's t-test; $t_{28} = 12.620$; $P < 0.001$; $n = 15$ células/8-10 animales por cada condición; Fig. 6E). Estos resultados sugieren que la MIA induce una mayor despolarización neta en el soma de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia en respuesta a la estimulación a 50 Hz de las colaterales de Schaffer.

7.3. La activación inmune materna incrementa la sumación espacial en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia

Para analizar el componente espacial de la integración sináptica se construyeron ventanas de integración sináptica. Dos electrodos de estimulación fueron colocados en el SR de CA1 a 100 y 300 μm del soma de la neurona. La intensidad de estimulación se ajustó para que cuando las dos vías de estimulación de las colaterales de Schaffer fueran estimuladas simultáneamente, la neurona disparara un PA en aproximadamente un 50% de los casos, como previamente se ha reportado (Pouille y Scanziani, 2001). La probabilidad de disparo ($P_{(\Delta t)}$) fue disminuyendo gradualmente conforme el Δt se incrementaba, hasta alcanzar valores cercanos a 0 a Δt de 40 ms. La figura 7A muestra trazos representativos de espigas generadas por la sumación de las dos vías de estimulación a Δt cercanos a 0 ms, mientras que a valores de Δt cercanos a los 40 ms no se generan espigas.

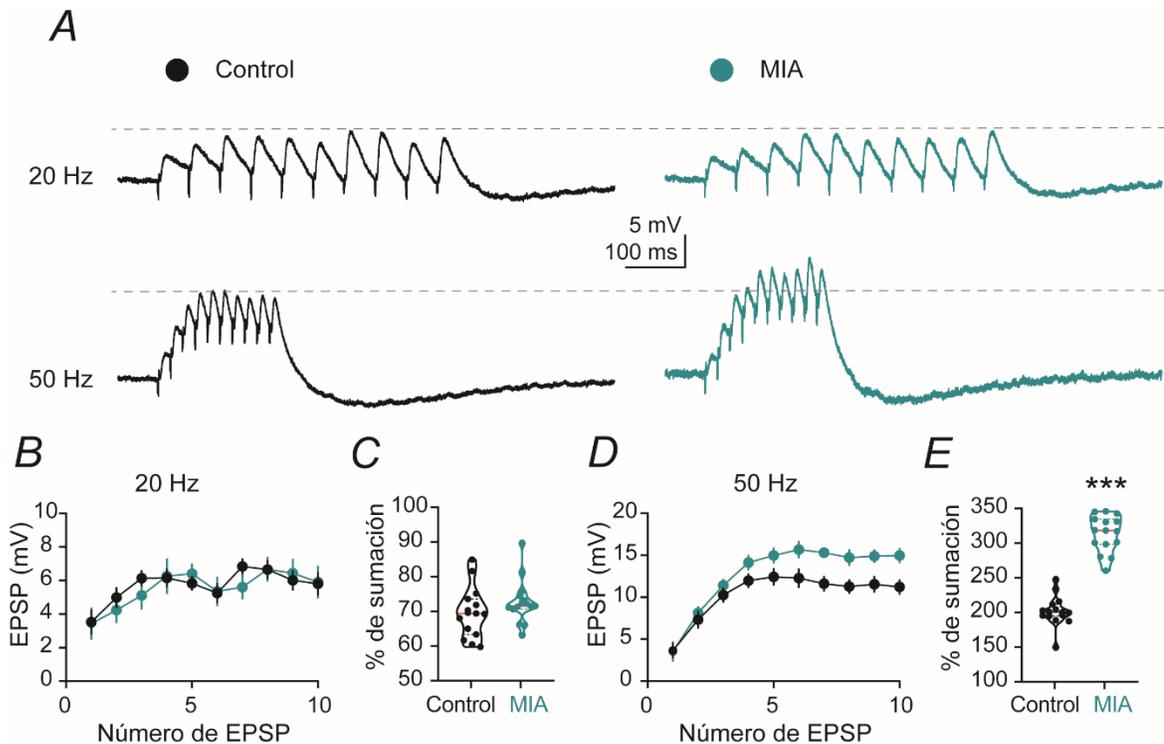


Figura 6 La MIA inducida por LPS aumenta la sumación temporal en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A) Trazos representativos de trenes de EPSPs evocados a 20 Hz y 50 Hz en neuronas piramidales de CA1 por estimulación extracelular de las colaterales de Schaffer. B) Gráfico que muestra la amplitud promedio de los EPSPs a lo largo de los trenes evocados a 20 Hz. C) Gráfico de violín que resume el porcentaje de sumación de los EPSPs evocados a 20 Hz en ambos grupos experimentales. D) Gráfico que muestra la amplitud promedio de los EPSPs a lo largo de los trenes evocados a 50 Hz. E) Gráfico de violín que resume el porcentaje de sumación de los EPSPs evocados a 50 Hz en ambos grupos experimentales. La línea roja en los gráficos de violín representa la media aritmética, mientras que las líneas punteadas señalan el primer y tercer cuartil. *** $P < 0.001$.

A los datos de $P_{(\Delta t)}$ se les ajustó una función de densidad de probabilidad continua de Lorentz para obtener el ancho medio de la ventana de integración (Fig. 7B). El ancho de la ventana fue significativamente mayor en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA en comparación con los ratones control (ancho de la ventana en control: 7.82 ± 0.34 ; en MIA: 17.71 ± 0.61 ; Student's t-test; $t_{28} = 14.160$; $P < 0.001$; $n = 15$ células/8-10 animales por cada condición; Fig. 7C).

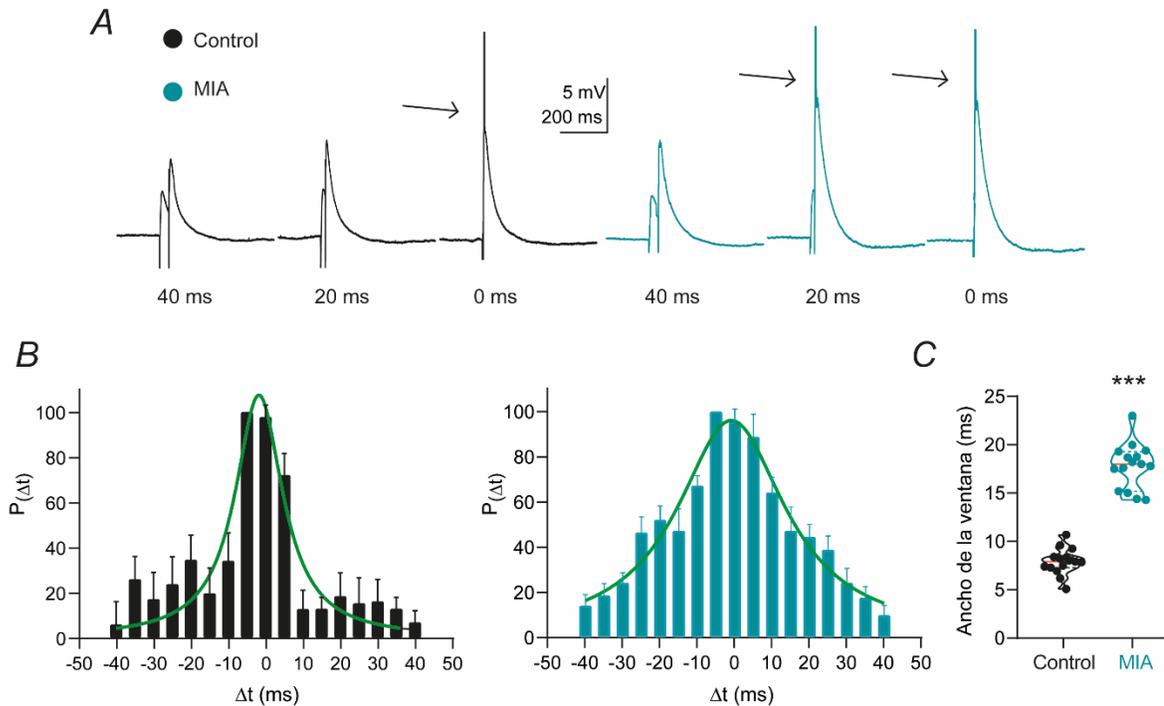


Figura 7 La MIA inducida por LPS prolonga la ventana de integración espacial en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A) Trazos representativos de EPSPs evocados mediante la estimulación de dos vías de las colaterales de Schaffer. En condiciones control, un AP es generado solamente cuando hay una estimulación simultánea de las dos vías o el Δt es cercano a cero, mientras que las neuronas piramidales de CA1 de animales expuestos a MIA generan espigas a Δt mayores. B) Histograma mostrando la $P_{(\Delta t)}$ en ambas condiciones experimentales. C) Gráfico de violín resumiendo el ancho de la ventana de integración mediante el ajuste de una función de densidad de probabilidad continua de Lorentz en ambos grupos experimentales. La línea roja en los gráficos de violín representa la media aritmética, mientras que las líneas punteadas señalan el primer y tercer cuartil. *** $P < 0.001$.

7.4 La activación inmune materna incrementa la excitabilidad intrínseca de neuronas piramidales de CA1 de la descendencia

Las propiedades computacionales de las neuronas dependen de tres factores fundamentales: la excitabilidad intrínseca, la complejidad morfológica de las dendritas y la inhibición sináptica perisomática. Por esa razón, decidimos explorar si la MIA inducida por LPS modifica estos tres factores. Primero, analizamos cambios en las propiedades “pasivas” de membrana, para lo cual se construyeron curvas I-V. La figura 8A muestra trazos de voltaje representativos ante pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes inyectados a neuronas piramidales de CA1 de ratones control y expuestos a MIA. Al analizar el comportamiento de la relación I-V, encontramos que en las neuronas piramidales de CA1 de los animales

expuestos a MIA la pendiente de la relación es más pronunciada (Fig. 8B). En ese sentido, aunque el PMR no fue diferente entre ambos grupos experimentales (RMP en control: -72.9 ± 0.79 mV; en MIA: -74.3 ± 0.56 mV; Student's t-test; $t_{58} = 1.543$; $P = 0.128$; $n = 30$ células/12-14 animales por cada condición; Fig. 8C), la R_N y la τ_{memb} estuvieron incrementadas en las neuronas piramidales de animales expuestos a MIA (R_N en control: $= 145.1 \pm 5.82$ M Ω ; en MIA $= 184.1 \pm 6.63$ M Ω ; Student's t-test; $t_{58} = 4.369$; $P < 0.001$; τ_{memb} en control: 15.6 ± 0.43 ms; en MIA: 18.7 ± 0.51 ms; Student's t-test; $t_{58} = 4.569$; $P < 0.001$; $n = 30$ células/12-14 animales por cada condición; Fig. 8D-E). Adicionalmente, la I_{Rheo} requerida para evocar al menos un PA estuvo disminuida en los animales cuyas madres fueron inyectadas con LPS durante la gestación (I_{Rheo} en control: 152.1 ± 8.41 mV; en MIA $= 127.1 \pm 5.07$ mV; Student's t-test; $t_{58} = 2.629$; $P = 0.011$; Fig. 8F).

Además de las propiedades pasivas de la membrana neuronal, también evaluamos las propiedades activas de las neuronas piramidales de CA1. Para ello, analizamos y comparamos la $f(I)$ de ambos grupos experimentales. La figura 8G muestra trazos de voltaje representativos evocados por la inyección de pulsos crecientes de corriente positiva (0, 150, 300 y 450 pA). La gráfica mostrada en la figura 8H muestra la $f(I)$ promedio a partir de todos los datos experimentales obtenidos. La línea de ajuste muestra un desplazamiento a la izquierda, revelando una mayor $f(I)$ en las neuronas piramidales de animales expuestos a MIA. Un análisis más detallado del disparo neuronal reveló cambios en la ganancia y en offset, dos parámetros que representan operaciones computacionales neuronales bien definidas. En comparación con las células control, las neuronas de animales expuestos a MIA mostraron una mayor ganancia (gain en control: 0.056 ± 0.005 Hz/pA; en MIA: 0.074 ± 0.004 Hz/pA; Student's t-test; $t_{58} = 2.387$; $P = 0.020$; $n = 30$ células/12-14 animales por cada condición; Fig. 8I) y un offset desplazado a valores más cercanos a cero (offset en control: 52.9 ± 1.17 pA; en MIA: 31.4 ± 1.09 pA; Student's t-test; $t_{58} = 13.390$; $P < 0.001$; $n = 30$ células/12-14 animales por cada condición; Fig. 8J). En conjunto, estos datos demuestran que la MIA inducida por

LPS modifica las propiedades biofísicas de la membrana que dan forma a la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.

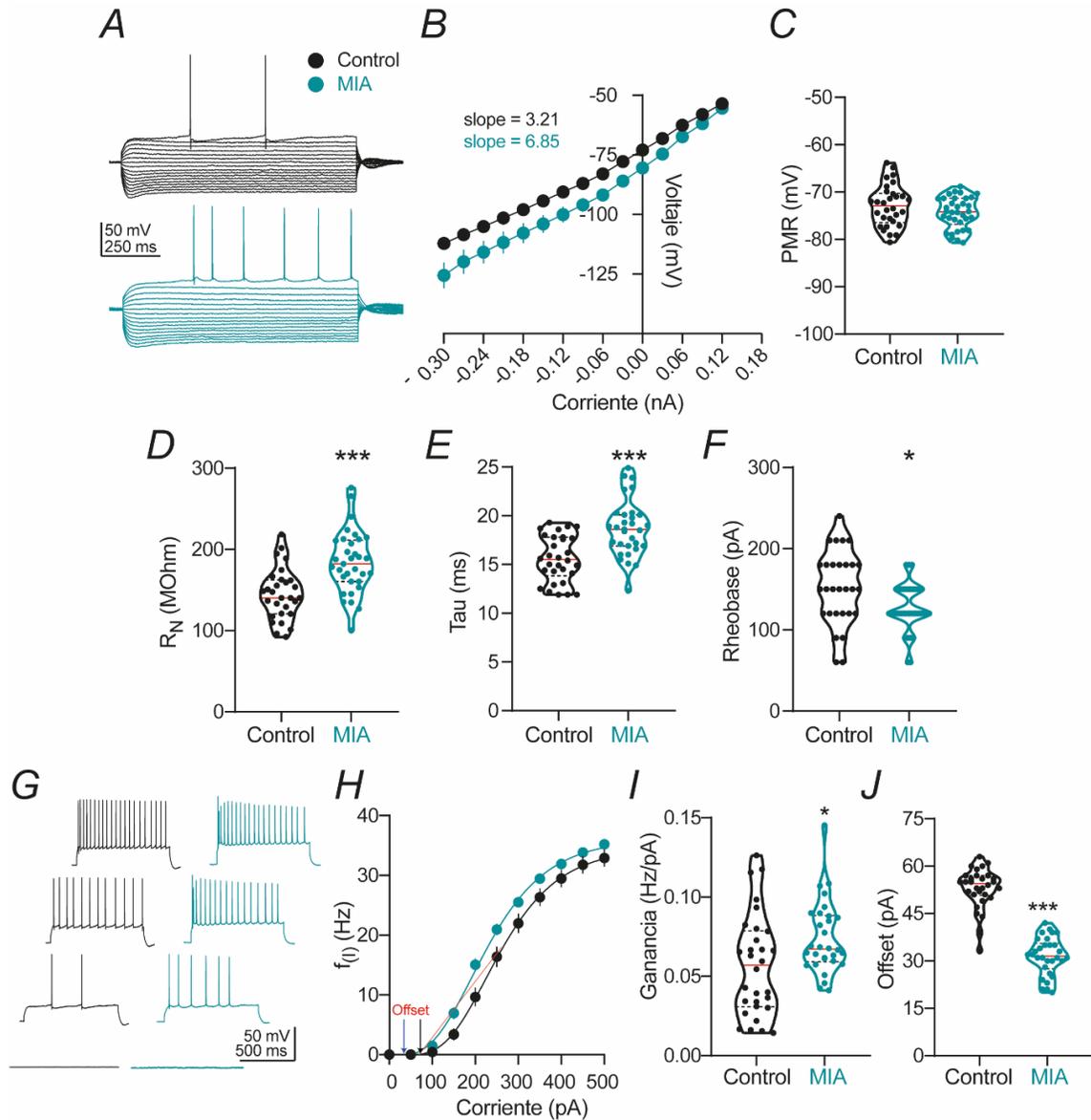


Figura 8 La MIA inducida por LPS incrementa la excitabilidad intrínseca y la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de la descendencia. A) Trazos de voltaje representativos ante pulsos de corriente hiper- y despolarizante. B) Gráfico mostrando la relación I-V de las neuronas piramidales de CA1 analizadas. Las neuronas de animales expuestos a MIA muestran una relación con una pendiente más pronunciada, sugiriendo cambios en las propiedades pasivas de la membrana. C-F) Gráficos de violín mostrando los efectos de la MIA en las propiedades eléctricas intrínsecas de la membrana de las neuronas piramidales de CA1. Aunque el PMR no mostró cambios (C), las neuronas de animales expuestos a MIA exhibieron una mayor R_N , así como una mayor; τ_{memb} (D-E). Como era de esperarse, la I_{Rheo} requerida para evocar un PA fue menor en animales expuestos a MIA. G) Trazos de trenes de PA evocados en neuronas piramidales de CA1. H) Gráfico mostrando una mayor frecuencia de disparo en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. I-J) Gráficos de violín mostrando que la MIA inducida por LPS aumenta la ganancia y disminuye el offset de las neuronas piramidales de CA1. La línea roja en los gráficos de violín

representa la media aritmética, mientras que las líneas punteadas señalan el primer y tercer cuartil. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

7.5. La activación inmune materna altera las propiedades biofísicas de la corriente de K^+ tipo A

Además de ser un determinante de la excitabilidad intrínseca y de la anatomía del PA, la corriente de K^+ tipo A (I_{KA}) es una conductancia fundamental para los procesos de filtrado e integración a nivel somatodendrítico. Dado que nuestros resultados sugieren un aumento de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1, decidimos explorar la expresión funcional y las propiedades biofísicas de la I_{KA} . La corriente total de K^+ (I_{Ktotal}) fue evocada y a partir de ella se aisló la I_{KA} (ver métodos para más detalles). La figura 9A muestra trazos representativos de la I_{KA} registrada en neuronas piramidales de CA1 de ratones control y expuestos a MIA. Se construyeron curvas V-I, para identificar el comportamiento de la I_{KA} observándose sistemáticamente una disminución en la amplitud al pico de la I_{KA} en las neuronas de ratones expuestos a MIA (Fig. 9B). Posteriormente, analizamos la activación dependiente del voltaje de la I_{KA} . Observamos que las neuronas de ratones expuestos a MIA exhibieron una ligera menor dependencia al voltaje, ya que requirieron una mayor despolarización para activar a la I_{KA} comparado con los animales control. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($V_{1/2\text{ act}}$ en control: -37.4 ± 2.90 mV; en MIA: -27.8 ± 4.13 mV; Student's t-test; $t_{12} = 1.903$; $P = 0.081$; $n = 7$ células/5 animales por cada condición; Fig. 9C). No obstante, el factor k sí fue significativamente menor (k en control: 16.6 ± 0.52 mV; en MIA: 8.7 ± 0.33 mV; Student's t-test; $t_{12} = 9.494$; $P < 0.001$). En contraste, la inactivación de la I_{KA} no mostró diferencias entre ambos grupos experimentales ($V_{1/2\text{ act}}$ en control: -57.6 ± 2.41 mV; en MIA: -59.2 ± 2.34 mV; Student's t-test; $t_{12} = 0.489$; $P = 0.633$; k en control: -8.4 ± 0.39 mV; en MIA: -7.7 ± 0.60 mV; Student's t-test; $t_{12} = 0.873$; $P = 0.399$; Fig. 9D). Finalmente, analizamos el efecto de la MIA en la recuperación del estado inactivado de la I_{KA} mediante la determinación del tiempo de recuperación ($t_{1/2\text{ rec}}$). Encontramos que el $t_{1/2\text{ rec}}$ fue significativamente

mayor en la I_{KA} de ratones expuestos a MIA ($t_{1/2rec}$ en control: 48.7 ± 1.42 ms; en MIA: 54.6 ± 1.63 ms; Student's t-test; $t_{12} = 2.722$; $P = 0.018$; Fig. 9E). Estos datos sugieren que el incremento en la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA se debe, probablemente, a cambios en la expresión funcional y propiedades biofísicas de canales de potasio Kv4. Lo que, además, podría explicar en buena medida los cambios observados en la integración sináptica, dada la participación de estos canales en los procesos de filtrado de la información sináptica que ocurren en las dendritas de las neuronas piramidales de CA1.

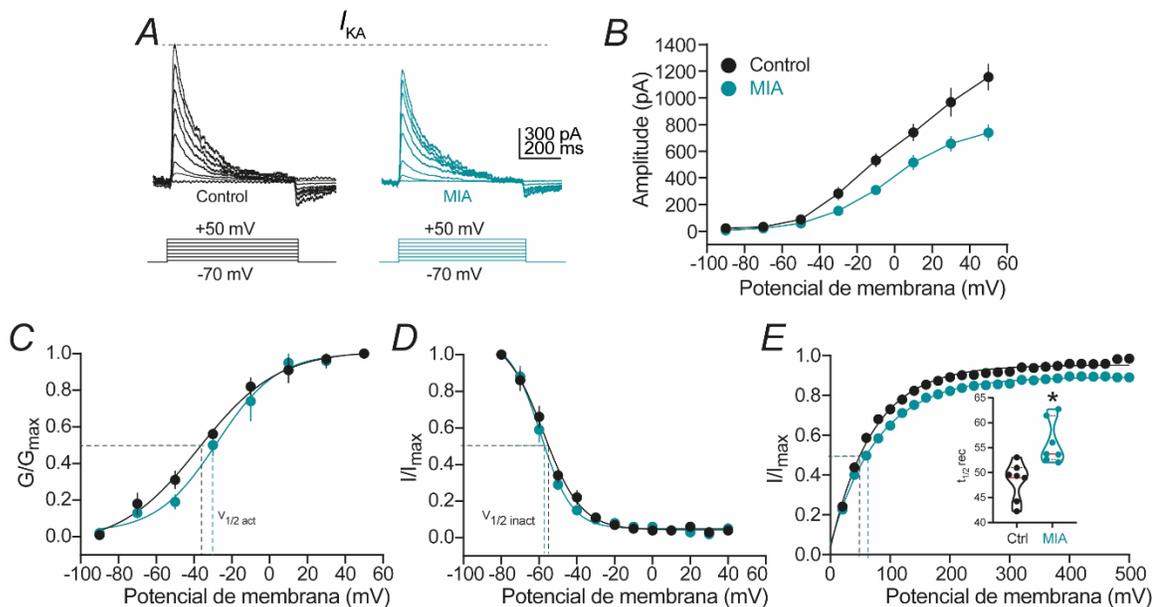


Figura 9 La MIA inducida por LPS disminuye la expresión funcional y altera las propiedades biofísicas de la I_{KA} en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A) Trazos representativos de la I_{KA} evocada en neuronas piramidales de CA1 de ratones control y expuestos a MIA. B) La I_{KA} en ratones expuestos a MIA es considerablemente de menor amplitud que la evocada en ratones control a lo largo de prácticamente todos los test de voltaje empleados. C) La MIA parece alterar la activación dependiente del voltaje de la I_{KA} desplazando la curva de activación hacia potenciales de membrana más despolarizados. D) Por otro lado, la inactivación de la I_{KA} no parece estar afectada en ratones expuestos a MIA. E) El análisis de la recuperación de la inactivación de la I_{KA} reveló que en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a LPS durante el desarrollo, la I_{KA} requiere de más tiempo para recuperarse del estado inactivado y así regresar a un estado susceptible de apertura. * $P < 0.05$.

7.6. La activación inmune materna reduce la complejidad morfológica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia

El segundo factor determinante de las capacidades computacionales de las neuronas es la geometría dendrítica, y la complejidad morfológica en general. Para analizar si la MIA inducida por LPS modifica la complejidad morfológica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia, se realizaron análisis morfométricos de neuronas que se llenaron con biocitina durante los registros electrofisiológicos, y de las cuales se obtuvieron fotografías de alta resolución y a diferentes planos focales mediante microscopía confocal. De las imágenes adquiridas se realizaron reconstrucciones digitales de alta fidelidad, con las cuales se llevó a cabo el análisis morfológico (Fig. 10A). Mediante el análisis de Sholl (Valle-Bautista et al., 2020) se evaluó si la MIA indujo alteraciones en morfología dendrítica. Los datos revelaron que las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA son morfológicamente menos complejas al poseer un menor número de intersecciones a lo largo de su eje dendrítico (Fig. 10B). La cuantificación de ello se realizó mediante la determinación del área bajo la curva (AUC en control: 6128 ± 246.7 ; en MIA: 5059 ± 160.2 ; Student's t-test; $t_{18} = 3.635$; $P = 0.002$; $n = 10$ células/8 animales por cada condición; Fig. 10C). Al analizar otros parámetros morfológicos, encontramos que el radio crítico (r_c) no estuvo alterado (r_c en control: $200.0 \pm 6.83 \mu\text{m}$; en MIA: $210 \pm 4.47 \mu\text{m}$; Student's t-test; $t_{18} = 1.225$; $P = 0.236$; Fig. 10D). Sin embargo, el número máximo de intersecciones (N_{max} en control: 34.10 ± 0.88 ; en MIA: 28.20 ± 1.87 ; Student's t-test; $t_{18} = 2.847$; $P = 0.011$; Fig. 10E), el número total de intersecciones (en control: 697.50 ± 22.97 ; en MIA: 580.10 ± 24.64 ; Student's t-test; $t_{18} = 3.489$; $P = 0.003$; Fig. 10F) y la longitud dendrítica total (en control: $9177 \pm 335.11 \mu\text{m}$; en MIA: $7769 \pm 398.70 \mu\text{m}$; Student's t-test; $t_{18} = 2.704$; $P = 0.014$; Fig. 10G) estuvieron disminuidos en los ratones expuestos a MIA durante el desarrollo. Finalmente, se calculó el índice de complejidad dendrítica (DIC) mediante el uso de una ecuación que considera, además del número de dendritas, el número total y el orden de los puntos de

ramificación (ver métodos para detalles). Los datos revelaron un menor DCI en las neuronas piramidales de CA1 de ratones cuyas madres fueron inoculadas con LPS durante la gestación (DCI en control: $2.73 \times 10^4 \pm 1.06 \times 10^3$; en MIA: $1.47 \times 10^4 \pm 1.16 \times 10^3$; Student's t-test; $t_{18} = 7.949$; $P < 0.001$; Fig. 10H). En su conjunto, estos datos demuestran que la MIA inducida por LPS genera alteraciones tanto a nivel electrofisiológico como morfológico en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia, lo que contribuiría a una mayor sumación de los inputs excitadores.

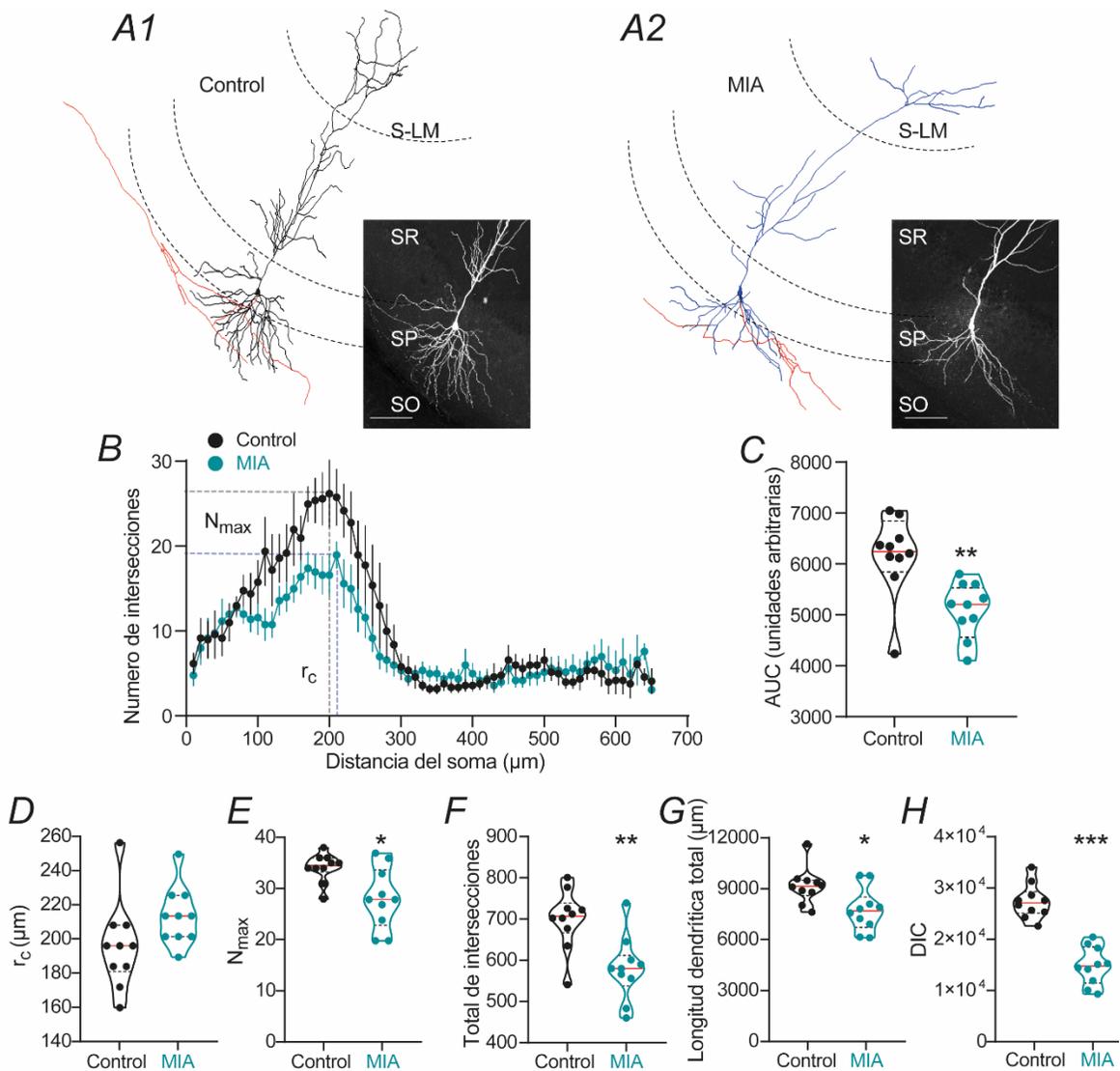


Figura 10 La MIA inducida por LPS disminuye la complejidad morfológica de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A) Reconstrucciones digitales de neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a SSI (A1) o LPS (A2) durante el desarrollo. En negro o azul se muestran el soma y las dendritas, mientras que en rojo el axón. B) Mediante el análisis de Sholl se determinó el número de intersecciones, las cuales fueron graficadas con respecto a la distancia del soma. Las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA mostraron un menor número de intersecciones a lo largo del eje dendrítico. C) Gráfico de violín mostrando el área bajo la curva de los gráficos en B). D) El radio crítico no mostró cambios entre ambos grupos experimentales. E-G) El número máximo de intersecciones, el número total de intersecciones y la longitud dendrítica total estuvieron disminuidos en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA en comparación con los controles. H) El cálculo del índice de complejidad dendrítico reveló una menor complejidad en el árbol dendrítico total de las neuronas de animales expuestos a MIA. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

7.7 La activación inmune materna reconfigura el balance excitación-inhibición en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia

El tercer factor determinante de la integración neuronal es la inhibición sináptica, particularmente aquella que tiene como blanco, la región perisomática de las neuronas piramidales de CA1. Por ese motivo, analizamos la transmisión sináptica espontánea excitadora e inhibitoria (sEPSC e sIPSC, respectivamente) que reciben las neuronas piramidales de ratones cuyas madres fueron inyectadas con SSI o con LPS. Las sEPSC e sIPSC fueron registradas a un potencial de membrana de -70 mV y 0 mV, respectivamente (ver métodos para detalles). Bajo esas condiciones, registramos la actividad espontánea por 5 minutos, y la amplitud y frecuencia de los eventos registrados fueron analizados. Las figuras 11A y 11B muestran trazos representativos de sEPSC en ambas condiciones experimentales. La figura 11C muestra que la MIA desplaza la curva de probabilidad acumulada de las amplitudes de las sEPSC hacia valores más grandes (Kolmogorov-Smirnov test; $P < 0.001$; $n = 10$ células/7 animales por cada condición; Fig. 11C), lo cual se confirma al analizar la amplitud media de los sEPSC (amplitud en control: 11.28 ± 0.66 pA; en MIA: 15.86 ± 1.38 pA; Student's t-test; $t_{18} = 2.988$; $P = 0.008$; Fig. 11C inset). Así mismo, la curva de probabilidad acumulada de la frecuencia de las sEPSC también se encuentra desplazadas hacia la derecha en las neuronas piramidales de CA1 de animales expuestos a MIA, sugiriendo un arribo a mayor frecuencia de la actividad sináptica excitadora (Kolmogorov-Smirnov test; $P =$

0.009; Fig. 11D). Lo anterior se confirma al analizar la frecuencia instantánea (IF) media de las sEPSC registrados (IF en control: 9.25 ± 0.53 Hz; en MIA: 11.10 ± 0.51 Hz; Student's t-test; $t_{18} = 2.478$; $P = 0.025$; Fig. 11D inset). También se analizó la cinética de las sEPSC; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Fig. 11E-F). La perfusión de ácido kinurénico (2 mM) al final de cada experimento permitió confirmar la naturaleza glutamatérgica de las corrientes registradas.

Respecto de la actividad GABAérgica espontánea, las figuras 11G y 11H muestran trazos representativos de sIPSC en ambas condiciones experimentales. En las neuronas piramidales de CA1 de animales expuestos a MIA, la curva de probabilidad acumulada de las amplitudes de las sIPSC se desplazó hacia la izquierda, esto es a valores de amplitud menores (Kolmogorov-Smirnov test; $P = 0.008$; Fig. 11I). No obstante, al analizar la amplitud media de las sIPSC no hubo diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales (amplitud en control: 30.44 ± 3.66 pA; en MIA: 23.86 ± 2.51 pA; Student's t-test; $t_{18} = 1.483$; $P = 0.157$; Fig. 11I inset). De manera similar, la MIA produjo un desplazamiento en la distribución de las frecuencias, a valores más pequeños (Kolmogorov-Smirnov test; $P < 0.001$; Fig. 11J). En consecuencia, la FI media de las sIPSC fue menor en animales expuestos a MIA (IF en control: 5.66 ± 0.28 Hz; en MIA: 3.99 ± 0.32 Hz; Student's t-test; $t_{18} = 3.864$; $P < 0.001$; Fig. 11J inset). Finalmente, el análisis cinético de las sIPSC reveló un discreto incremento en el tiempo de decaimiento (DT) sin modificaciones en el tiempo de subida (RT) de las sIPSC (Fig. 11K-L). La perfusión de bicuculina (10 μ M) o PTX (50 μ M) al final de cada experimento permitió confirmar la naturaleza GABAérgica de las corrientes registradas. En su conjunto, estos resultados sugieren modificaciones en el balance excitación-inhibición (E-I) en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia de ratonas inoculadas con LPS. Particularmente llamativa resulta la disminución en la frecuencia de las sIPSC, sugiriendo alteraciones presinápticas en la inhibición sobre las neuronas piramidales de CA1.

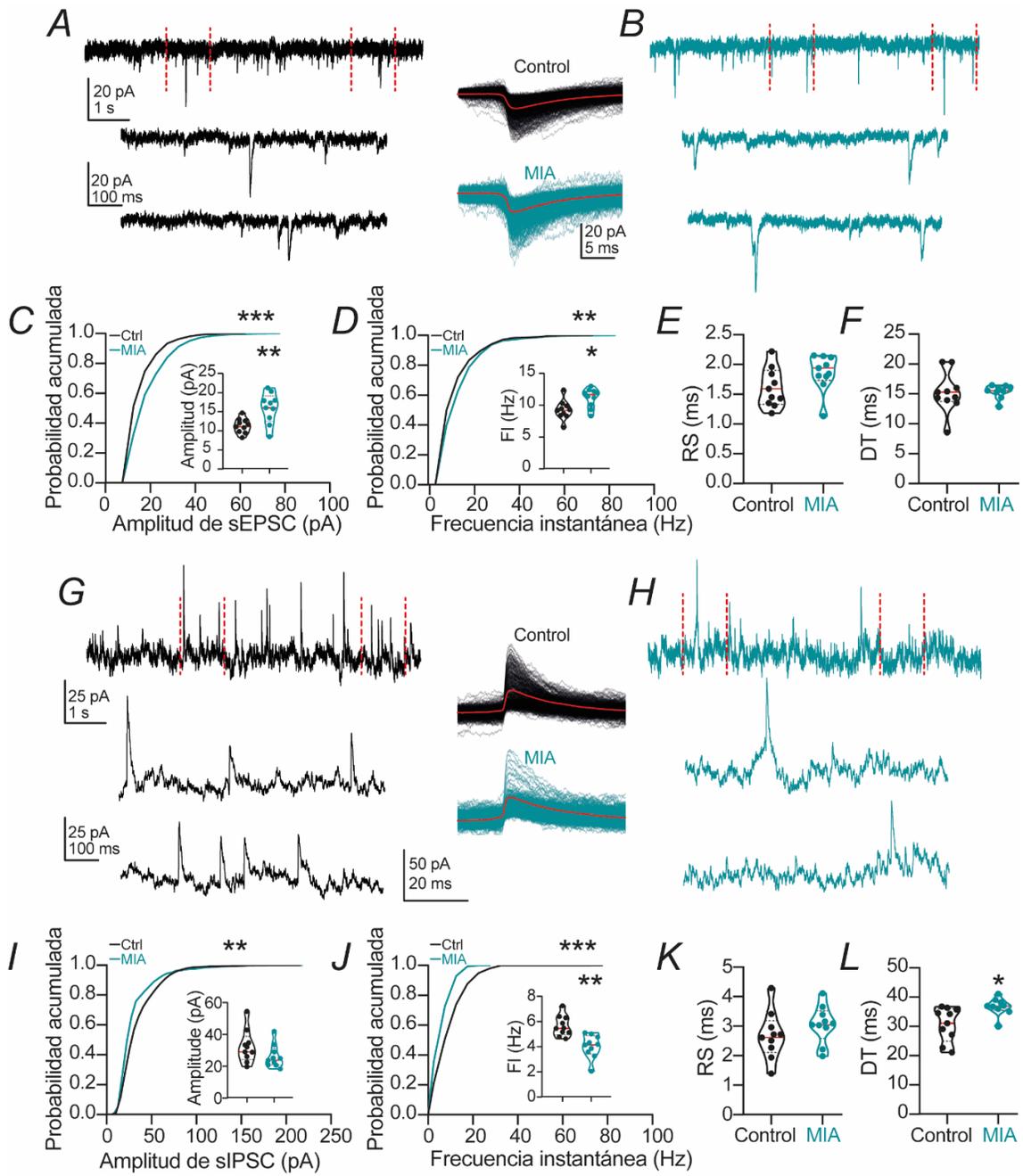


Figura 11 La MIA inducida por LPS disminuye la inhibición y reconfigura el balance E-I en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A-B) Trazos representativos a diferentes escalas temporales de actividad sináptica espontánea excitadora (sEPSC) registrada en neuronas piramidales de CA1 de animales expuestos a SSI o MIA durante el desarrollo. C) Gráfico de probabilidad acumulada mostrando una redistribución de las amplitudes de las sEPSC hacia valores más grandes. Inset: gráfico de violín resumiendo las diferencias en la amplitud media de las sEPSC entre ambas condiciones experimentales. D) Gráfico de probabilidad acumulada mostrando una redistribución de la FI de las sEPSC hacia valores más grandes. Inset: gráfico de violín resumiendo las diferencias en la FI media de las sEPSC entre ambas condiciones experimentales. E-D) Gráficos de violín mostrando que la MIA no produce alteraciones en la cinética de las sEPSC registradas en las neuronas piramidales de CA1. G-H) Trazos representativos a diferentes escalas temporales de actividad sináptica espontánea inhibitoria (sIPSC) registrada en neuronas piramidales de CA1 de animales expuestos a SSI o MIA durante el desarrollo. C) Gráfico de probabilidad acumulada mostrando una redistribución de las amplitudes de las sIPSC hacia valores más pequeños. Inset: gráfico de violín resumiendo las diferencias en la amplitud media de las sIPSC entre ambas condiciones experimentales. D) Gráfico de probabilidad acumulada mostrando una redistribución de la FI de las sIPSC hacia valores más grandes. Inset: gráfico de violín resumiendo las diferencias en la FI media de las sIPSC entre ambas condiciones experimentales. K-L) Gráficos de violín mostrando las diferencias en la cinética de los sIPSC entre ambas condiciones experimentales. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

7.8. La activación inmune materna disminuye la inhibición GABAérgica mediada por interneuronas PV+ y CCK+ en la descendencia

La inhibición perisomática ejerce un control importante sobre la sumación de la actividad sináptica excitadora. En CA1, resulta particularmente relevante la inhibición perisomática proveniente de IN PV+ e IN CCK+. Como primera aproximación, decidimos explorar la expresión de la enzima GAD67 en el hipocampo, como una medida indirecta de la inhibición GABAérgica. La figura 12A muestra una imagen representativa del área CA1 que revela un menor número de células inmunorreactivas a GAD67 en el área CA1 de ratones expuestos a MIA en comparación con los ratones control. Lo anterior fue corroborado mediante un análisis cuantitativo (en control: 60.56 ± 4.45 ; en MIA: 45.44 ± 5.48 ; Student's t-test; $t_{16} = 2.139$; $P = 0.048$; $n = 9$ rebanadas/3 animales por cada condición Fig. 12B). Posteriormente, exploramos directamente la transmisión GABAérgica proveniente de IN PV+ e IN CCK+ en las neuronas piramidales de CA1, haciendo uso de la manipulación farmacológica de estas clases de interneuronas GABAérgicas especializadas en la inhibición perisomática en CA1.

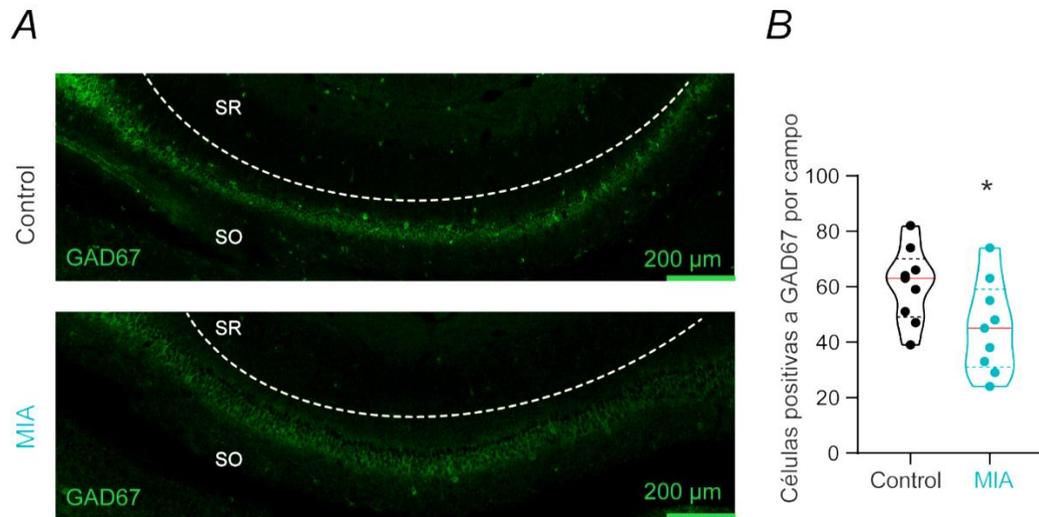


Figura 12 La MIA inducida por LPS reduce el número de células inmunorreactivas a GAD67 en el área CA1 de la descendencia. A) Inmunofluorescencia para la detección de GAD67 en el área CA1 del hipocampo de ratones expuestos a SSI o LPS durante la gestación. B) El análisis cuantitativo reveló una disminución significativa del número de células GAD67+, señal de un menor número de putativas interneuronas GABAérgicas. Cada punto en los gráficos de violín es el promedio de 3-4 campos de conteo en una rebanada. * $P < 0.05$.

Estimulando con un electrodo extracelular localizado en el SR a $\sim 150 \mu\text{m}$ del SP de CA1, se evocaron corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) a un potencial de membrana fijo a 0 mV y en presencia de D-APV ($50 \mu\text{M}$). Se adquirió un registro basal durante 10 minutos y posteriormente se registraron las IPSC en presencia del agonista específico de los receptores a endocannabinoides tipo CB1, WIN 55, 212-2 ($2 \mu\text{M}$) durante 10 minutos más. La figura 13A-B muestra trazos representativos de las corrientes evocadas bajo las diferentes condiciones farmacológicas, así como cursos temporales representativos obtenidos de registros en animales control (13A) como en animales expuestos a MIA (13B). La estimulación del receptor CB1 redujo la amplitud de las IPSC en $\sim 25\%$ en los animales control. Al analizar el efecto en los animales expuestos a MIA, observamos que la activación de los receptores CB1 redujo la amplitud de las IPSC en $\sim 12\%$, lo cual es significativamente menor a lo observado en animales control (amplitud durante WIN en control: $74.07 \pm 1.31\%$; en MIA: $88.54 \pm 1.94\%$; Student's t-test; $t_9 = 6.614$; $P < 0.001$; $n = 10$ células/7 animales por cada condición; Fig. 13C).

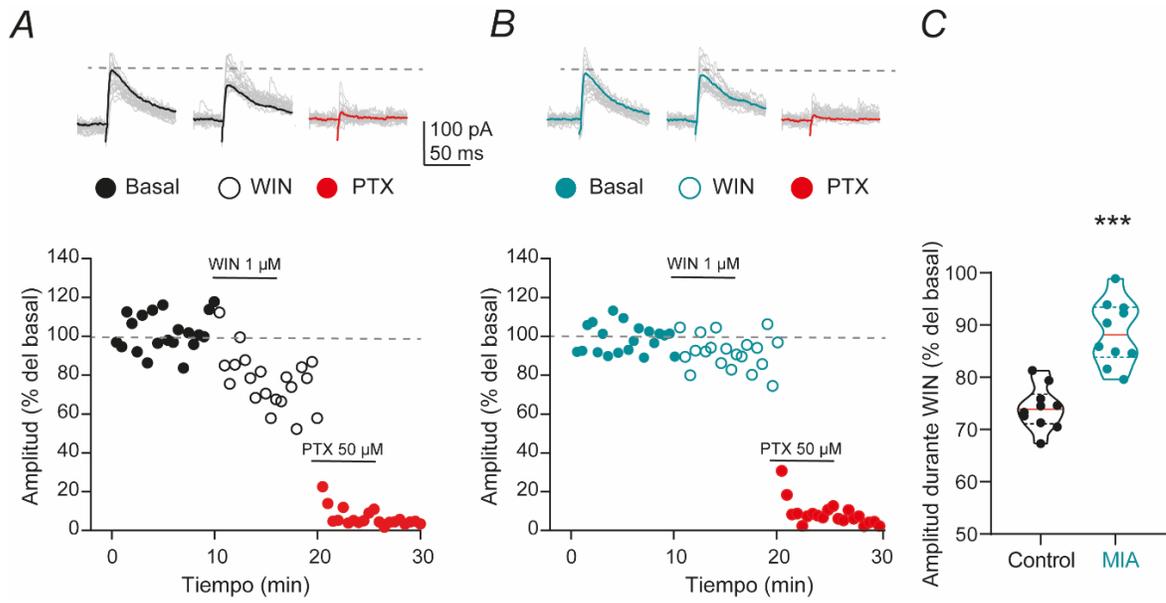


Figura 13 La MIA inducida por LPS reduce el efecto del WIN 55, 212-2 en la amplitud de las IPSC registradas en neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A-B) Trazos representativos de IPSC registradas en neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a SSI o MIA durante el desarrollo prenatal. En la parte inferior se muestran los cursos temporales de una neurona de una neurona control (A) y una neurona de un ratón expuesto a MIA (B). Al final de cada experimento se bloqueó la transmisión GABAérgica con PTX para corroborar la naturaleza de las respuestas evocadas. C) Gráficos de violín mostrando la reducción en el efecto del WIN 55, 212-2 en la amplitud de las IPSC de neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. *** $P < 0.001$.

Después, usamos la activación de receptores opioides tipo μ como estrategia de silenciamiento sináptico de INs PV+. La figura 14A-B muestra trazos representativos de las corrientes evocadas bajo las diferentes condiciones farmacológicas, así como cursos temporales representativos obtenidos de registros en animales control (Fig. 14A) como en animales expuestos a MIA (Fig. 14B). La estimulación del receptor opioide redujo la amplitud de las IPSC en $\sim 45\%$ en los animales control. Al analizar el efecto en los animales expuestos a MIA, observamos que la activación de los receptores opioides tipo μ redujo la amplitud de las IPSC en $\sim 39\%$, lo cual, aunque discreto, es significativamente menor a lo observado en animales control (amplitud durante DAMGO en control: $56.18 \pm 1.41\%$; en MIA: $61.55 \pm 2.24\%$; Student's t-test; $t_9 = 2.944$; $P = 0.016$; $n = 10$ células/7 animales por cada condición; Fig. 14C). Lo anterior sugiere que la inhibición perisomática sobre las neuronas piramidales de CA1 de animales

expuestos a MIA está disminuida, particularmente aquella proveniente de IN CCK+ y, en menor medida, IN PV+.

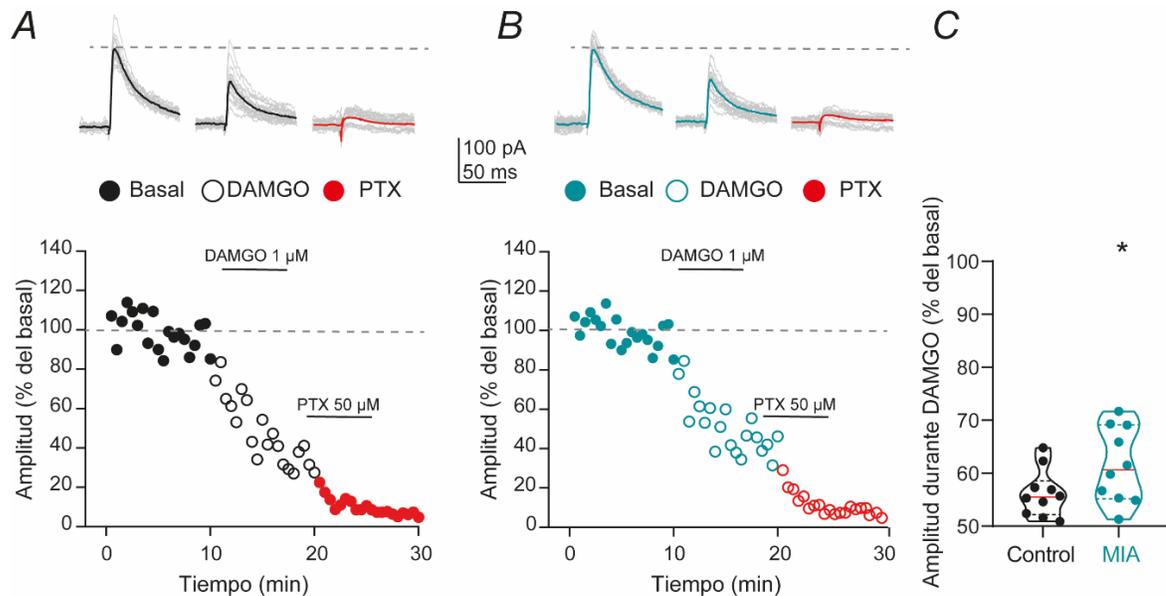


Figura 14 La MIA inducida por LPS reduce el efecto del DAMGO en la amplitud de las IPSC registradas en neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. A-B) Trazos representativos de IPSC registrados en neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a SSI o MIA durante el desarrollo prenatal. En la parte inferior se muestran los cursos temporales de una neurona control (A) y una neurona de un ratón expuesto a MIA (B). Al final de cada experimento se bloqueó la transmisión GABAérgica con PTX para corroborar la naturaleza de las respuestas evocadas. C) Gráficos de violín mostrando la reducción en el efecto del DAMGO en la amplitud de las IPSC de neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. * $P < 0.05$.

7.9. El bloqueo de la transmisión GABAérgica normaliza la integración sináptica en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia.

Para determinar si las alteraciones observadas en la transmisión GABAérgica sobre las neuronas piramidales de CA1 son el factor determinante de la mayor capacidad de sumación espaciotemporal observada en las crías de ratonas inyectadas con LPS durante la gestación, se procedió a evaluar la integración sináptica en presencia de PTX (50 μ M).

Primero, evaluamos la sumación temporal, repitiendo el protocolo de estimulación repetitiva a 50 Hz, que fue donde encontramos diferencias entre ambos grupos experimentales. Tal y como habíamos observado previamente, la sumación temporal fue significativamente mayor en los animales expuestos a MIA con

respecto a los controles (% de sumación en control: 199.71 ± 2.49 %; en MIA: 311.52 ± 10.82 %; Student's t-test; $t_{14} = 10.160$; $P < 0.001$; $n = 8$ células/4 animales por cada condición; Fig. 15A, D). Para identificar la dependencia de ese incremento en la sumación a las alteraciones GABAérgicas observadas y no a modificaciones en otros mecanismos intrínsecos, decidimos bloquear farmacológicamente a la corriente h (I_h) mediada por canales operados por nucleótidos cíclicos y activados por hiperpolarización (HCN) mediante el bloqueador selectivo ZD-7288 ($20 \mu\text{M}$). Si bien, el bloqueo de la I_h incrementa el porcentaje de sumación, lo hace en similar magnitud tanto en animales control como en aquellos expuestos a MIA. De tal manera que, las neuronas piramidales de CA1 de ratones cuyas madres fueron inoculadas con LPS siguieron mostrando una sumación incrementada (% de sumación en control: 268.30 ± 9.96 %; en MIA: 358.41 ± 15.38 %; Student's t-test; $t_8 = 4.916$; $P = 0.002$; $n = 5$ células/4 animales por cada condición; Fig. 15B, D). Después perfundimos la cámara de registro con PTX ($50 \mu\text{M}$) para bloquear por completo la transmisión GABAérgica. Bajo esas condiciones experimentales, la sumación temporal aumentó a un nivel tal, que en ambos grupos experimentales la sumación llegó a niveles similares, es decir, se normalizó (% de sumación en control: 374.12 ± 5.27 %; en MIA: 385.70 ± 5.55 %; Student's t-test; $t_8 = 1.504$; $P = 0.171$; Fig. 15C-D). Estos datos revelan que la mayor sumación temporal observada en la descendencia de ratonas inyectadas con LPS durante la gestación, se debe a una disminución en la inhibición GABAérgica sobre las neuronas piramidales de CA1.

Después, analizamos si las alteraciones de la transmisión GABAérgica también subyacen el incremento en el ancho de la ventana de sumación espacial de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia de ratones inyectadas con LPS durante la gestación. Para ello, repetimos el protocolo de sumación espacial descrito anteriormente. En la figura 16A1-B1 se muestran histogramas de $P_{(\Delta t)}$ en animales control y aquellos expuestos a MIA.

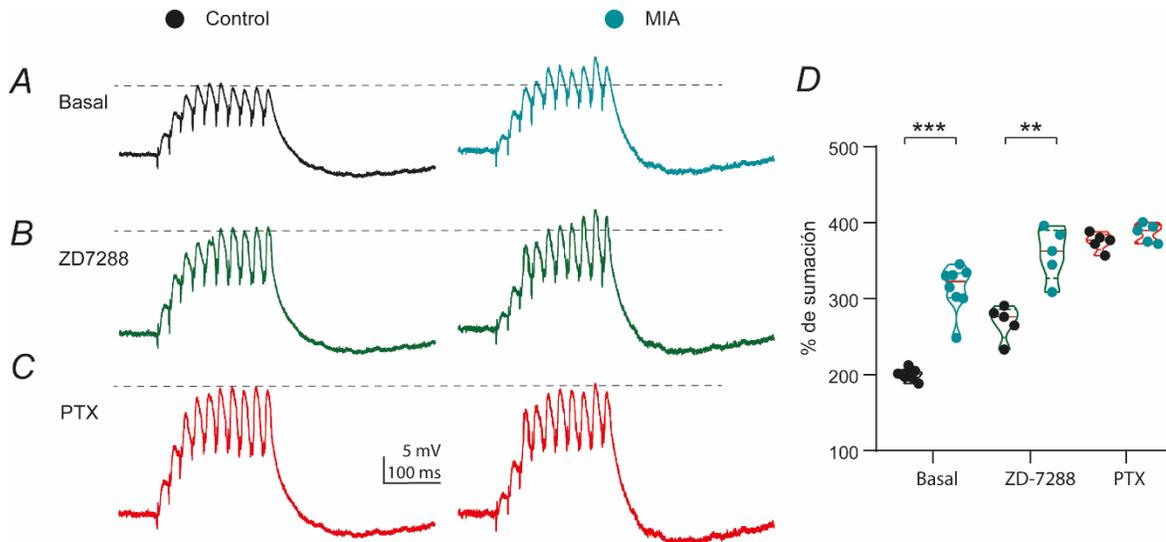


Figura 15 El bloqueo farmacológico de la transmisión GABAérgica normaliza los cambios observados en la sumación temporal en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. A-C) Trazos representativos de trenes de EPSPs evocados a 50 Hz en neuronas piramidales de CA1 por estimulación extracelular de las colaterales de Schaffer en condiciones basales (A), en presencia de ZD7288 (B) y en presencia de PTX (C) en ambos grupos experimentales. D) Gráficos de violín mostrando las diferencias en la sumación temporal entre animales control y aquellos expuestos a MIA. El ZD7288 aumenta la sumación en ambos grupos, sin normalizarla. Por otro lado, el bloqueo de la transmisión GABAérgica aumenta aún más la sumación, logrando normalizarla en ambos grupos experimentales. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Como se esperaba, el ancho de la ventana de integración espacial fue significativamente mayor en las neuronas piramidales de CA1 de animales expuestos a MIA (ancho de la ventana en control: 8.28 ± 0.42 ; en MIA: 19.08 ± 1.53 ; Student's t-test; $t_8 = 6.793$; $P < 0.001$; $n = 5$ células/4 animales por cada condición; Fig. 16C1). La adición de PTX al baño de registro generó un incremento significativo en la $P_{(\Delta t)}$, y en consecuencia en el ancho de la ventana de integración (Fig. 16A2-B2), alcanzando valores similares en ambos grupos experimentales (ancho de la ventana en control: 21.34 ± 0.71 ; en MIA: 22.44 ± 0.82 ; Student's t-test; $t_8 = 1.016$; $P = 0.339$; Fig. 16C2).

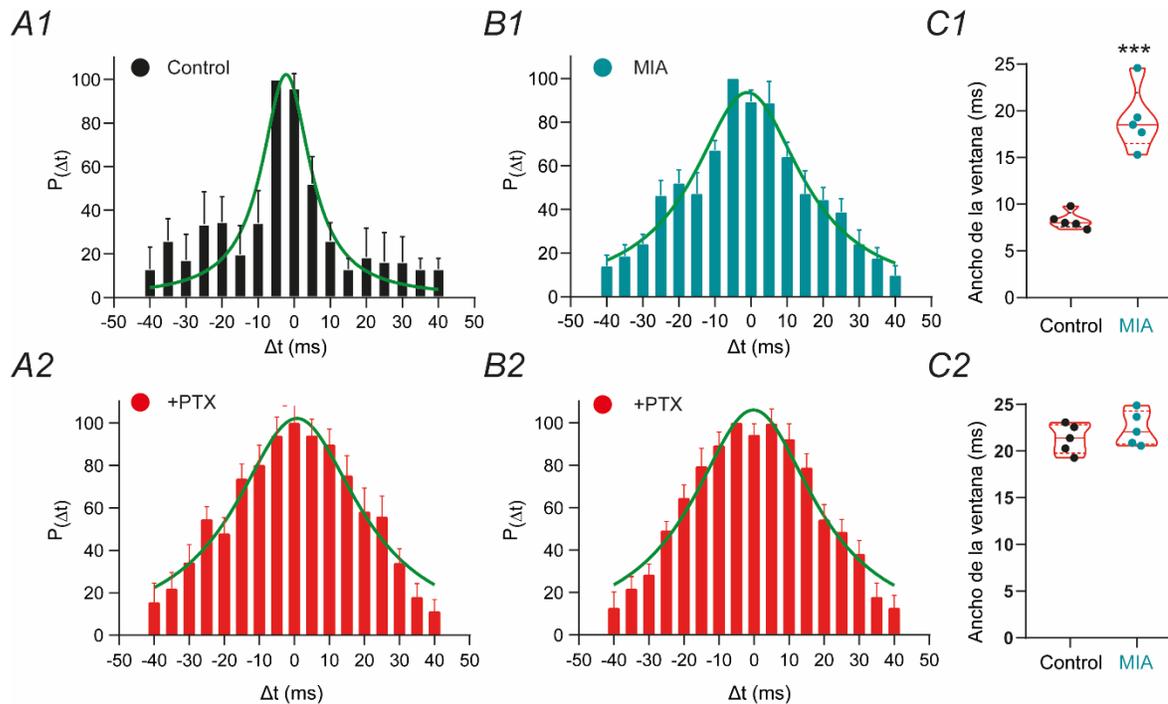


Figura 16 El bloqueo farmacológico de la transmisión GABAérgica normaliza los cambios observados en la sumación espacial en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. A1-B1) Histogramas mostrando la distribución de $P_{(\Delta t)}$ con respecto a los diferentes Δt en condiciones basales en neuronas piramidales de CA1 de ratones control (A1) y aquellos expuestos a MIA (B1). C1) Gráficos de violín mostrando el ancho de las curvas de integración obtenidas mediante un ajuste lorentziano a los histogramas de A1-B1. A2-B2) Histogramas mostrando la distribución de $P_{(\Delta t)}$ con respecto a los diferentes Δt en presencia de PTX (50 μ M) en neuronas piramidales de CA1 de ratones control (A2) y aquellos expuestos a MIA (B2). C2) Gráficos de violín mostrando el ancho de las curvas de integración obtenidas mediante un ajuste lorentziano a los histogramas mostrados en A2-B2. El bloqueo de la inhibición GABAérgica lleva la sumación espacial de ambos grupos experimentales a valores similares. *** $P < 0.001$.

7.10. Las alteraciones neurofisiológicas y neuroanatómicas en el hipocampo de la descendencia no se acompañan de un estado neuroinflamatorio

La microglía y los astrocitos son células del sistema inmune que residen en el cerebro y que juegan un rol preponderante durante el neurodesarrollo (Clarke & Barres, 2013; Sominsky et al., 2018). Se ha documentado que la MIA inducida por antígenos virales o bacterianos, altera la actividad y el número de células microgliales y astrocitos, lo que afecta el neurodesarrollo fetal (Petrelli et al., 2016). Por ello, decidimos analizar si la MIA inducida por LPS altera la densidad de la microglía y de los astrocitos en el hipocampo dorsal de la descendencia mediante

ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las microfotografías mostradas en las figuras 17A y 17C muestran adquisiciones representativas de células positivas para GFAP y CD-11b, marcadores de astrocitos y microglía, respectivamente. Contra toda expectativa, no se encontraron cambios significativos en el número de células positivas a GFAP (en control: 274.9 ± 14.74 células; en MIA: 316.10 ± 17.11 células; Student's t-test; $t_{16} = 1.821$; $P = 0.087$; $n = 9$ rebanadas/3 animales; Fig. 17B) ni en el número de células positivas a CD11-b (en control: 349.90 ± 26.19 células; en MIA: 393.11 ± 24.04 células; Student's t-test; $t_{16} = 1.213$; $P = 0.242$; Fig. 17D) entre ambos grupos experimentales. Estos datos sugieren que la MIA no altera el número de astrocitos y/o células de la microglía en la edad evaluada. Sin embargo, podría haber marcadores inflamatorios a nivel molecular que indiquen que los ratones expuestos a MIA cursan o cursaron por un proceso neuroinflamatorio. Por esta razón, decidimos medir la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de ratones expuestos a SSI o LPS en dos puntos del desarrollo postnatal (PND 1 y PND 28-35).

Consistente con la ausencia de alteraciones cuantitativas en la microglía y astrocitos, los ensayos de RT-qPCR no mostraron un incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de la descendencia. Curiosamente, en el PND1 parece haber una disminución en la expresión de estas citocinas (expresión relativa de TNF- α en control: 1.01 ± 0.04 ; en MIA: 0.88 ± 0.12 ; Student's t-test; $t_{10} = 0.934$; $P = 0.372$; Fig. 18A; expresión relativa de IL-1 β en control: 1.01 ± 0.04 ; en MIA: 0.39 ± 0.11 ; Student's t-test; $t_{10} = 5.328$; $P < 0.001$; Fig. 18B; expresión relativa de IL-6 en control: 1.02 ± 0.07 ; en MIA: 0.43 ± 0.10 ; Student's t-test; $t_{10} = 4.701$; $P < 0.001$; Fig. 18C). Mientras que en PND 28-35 no hubo cambios significativos en ninguna dirección en la expresión de estas citocinas (expresión relativa de TNF- α en control: 0.99 ± 0.09 ; en MIA: 0.81 ± 0.07 ; Student's t-test; $t_{18} = 1.602$; $P = 0.126$; Fig. 18D; expresión relativa de IL-1 β en control: 0.91 ± 0.12 ; en MIA: 0.84 ± 0.15 ; Student's t-test; $t_8 = 0.381$; $P = 0.713$; Fig. 18E; expresión relativa

de IL-6 en control: 1.19 ± 0.19 ; en MIA: 1.09 ± 0.27 ; Student's t-test; $t_{18} = 0.234$; $P = 0.817$; Fig. 18F).

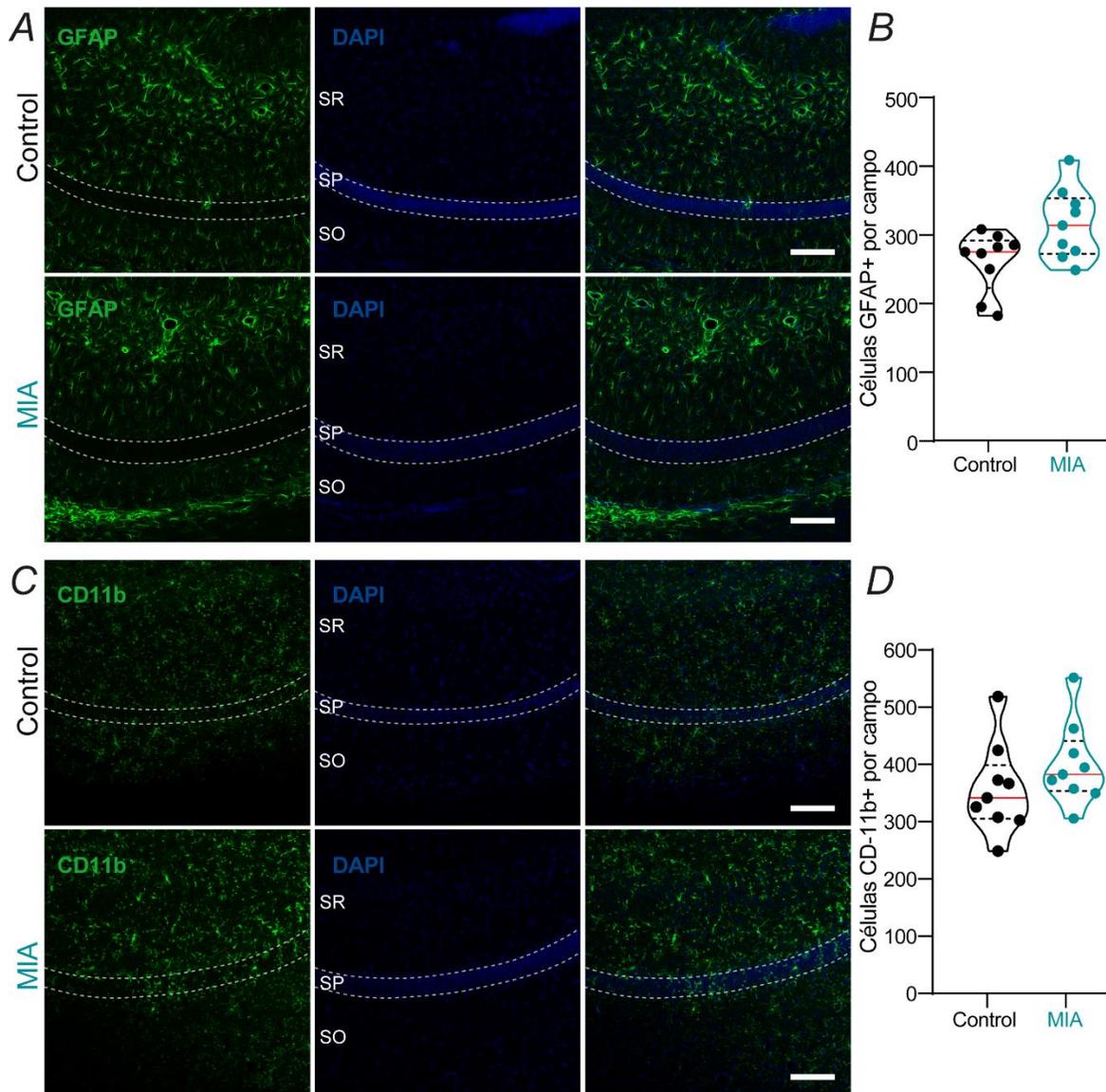


Figura 17 La MIA inducida por LPS no altera significativamente la densidad de astrocitos y microglía en el hipocampo dorsal de la descendencia. A) Imágenes confocales representativas del inmunomarcaje para astrocitos (GFAP+) en CA1. C) Imágenes confocales representativas del inmunomarcaje para microglía (CD-11b+) en CA1. B-D) Gráficos de violín mostrando una densidad de astrocitos (B) y microglía (D) en ambos grupos experimentales. Cada punto representa el conteo de un campo en una rebanada.

En su conjunto, nuestros datos sugieren que, aunque es altamente probable que la MIA inducida por LPS genere una respuesta inflamatoria materna que alcance al feto, esto ocurra únicamente durante el desarrollo intrauterino. Es decir, una vez

que se alcanza la vida extrauterina el proceso neuroinflamatorio comienza a atenuarse. Sin embargo, como nuestros datos muestran, persiste un importante desequilibrio en la expresión de citocinas en el hipocampo, y muy seguramente en otras estructuras cerebrales de la descendencia. Lo anterior es indicativo de que las alteraciones morfológicas y electrofisiológicas observadas en la descendencia de ratonas inyectadas con LPS se debe a procesos que ocurren fundamentalmente durante el periodo de desarrollo previo al nacimiento.

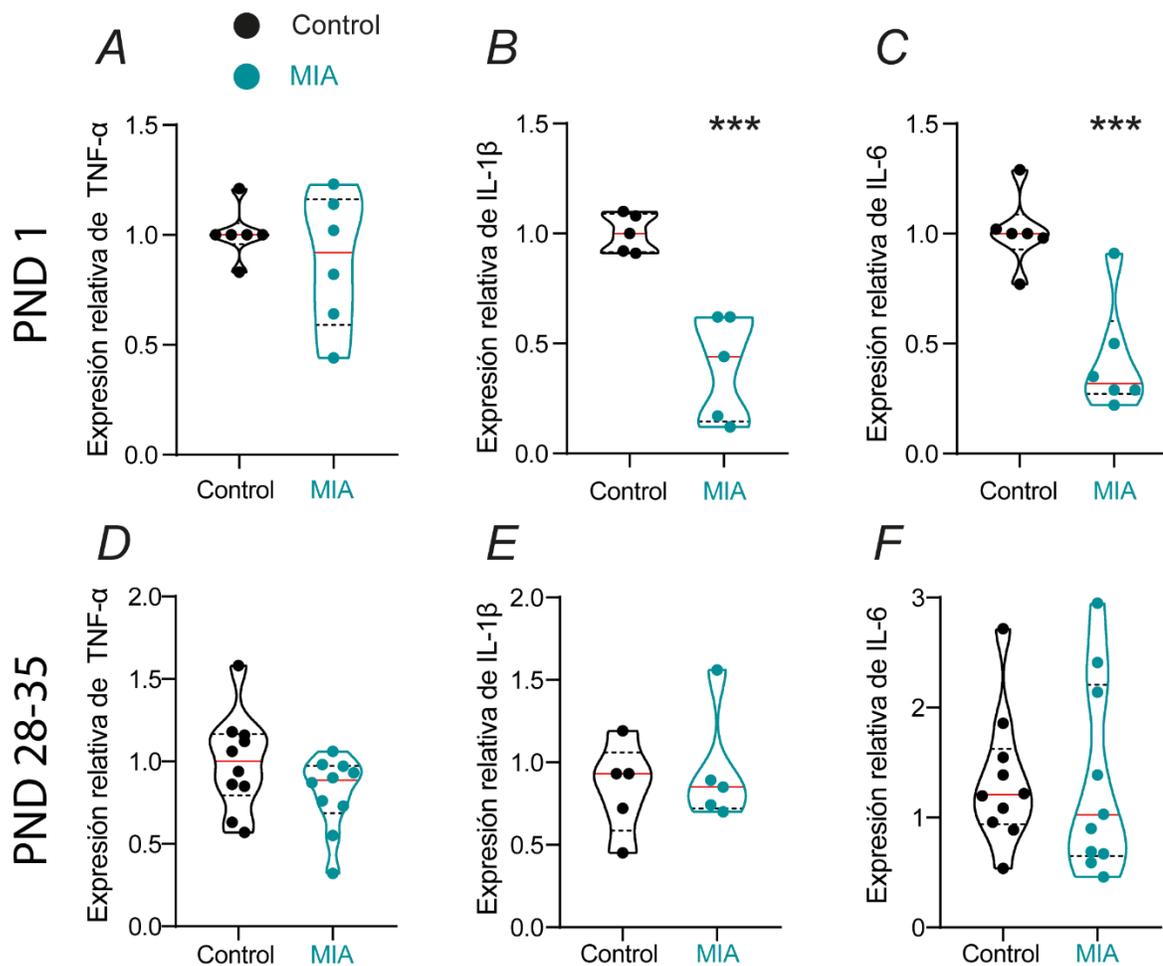


Figura 18 La MIA inducida por LPS no produce un estado neuroinflamatorio que persista hasta la edad juvenil en la descendencia. A-C) Gráficos de violín mostrando los efectos de la MIA en la expresión de citocinas proinflamatorias canónicas en el hipocampo de la descendencia en el PND 1. D-F) Gráficos de violín mostrando los efectos de la MIA en la expresión de citocinas proinflamatorias canónicas en el hipocampo de la descendencia en el PND 28-35. *** $P < 0.001$.

8. Discusión

En esta tesis hemos brindado evidencia experimental de las alteraciones anatómicas y neurofisiológicas que la MIA inducida por LPS genera en el hipocampo dorsal de la descendencia, en edad juvenil. En primer lugar, validamos un modelo de MIA mediante la inyección intraperitoneal de LPS en ratonas gestantes, el cual incrementó citocinas proinflamatorias canónicas a nivel sistémico y disminuyó el número de crías por camada. En las crías, la MIA indujo un incremento en la excitabilidad intrínseca, que se acompañó por una disminución en la complejidad dendrítica y en la inhibición GABAérgica perisomática sobre las neuronas piramidales de CA1. Estas alteraciones condujeron a una mayor integración dendrítica de las señales sinápticas excitadoras, tanto a nivel temporal como espacial. Las alteraciones neurobiológicas descritas en esta tesis representan un pródromo potencialmente relevante para comprender los trastornos neuropsiquiátricos asociados a la MIA que surgen durante la adolescencia, que fue la edad a la que se evaluaron estas alteraciones en nuestro modelo murino. Los síntomas precursores de padecimientos psiquiátricos, que preceden y anuncian el comienzo de ésta.

8.1. La activación inmune materna incrementa la integración sináptica y la excitabilidad neuronal en el hipocampo

El primer hallazgo de este trabajo fue que las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia de ratonas inyectadas con LPS durante la gestación mostraron una ventana temporal más amplia para la integración de la información sináptica y por ende un incremento en su probabilidad de disparo en respuesta a la actividad de otras neuronas. La integración sináptica es un fenómeno fundamental en la fisiología neuronal y depende fundamentalmente de 3 factores: la excitabilidad intrínseca neuronal, la geometría y complejidad dendrítica y la inhibición a nivel perisomático ejercido por interneuronas GABAérgicas. En ese sentido, nosotros encontramos que tanto la sumación temporal como la espacial estuvieron incrementadas en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA.

Por un lado, la sumación espacial permite la integración de eventos sinápticos provenientes de diferentes partes de una neurona, por lo que implica más de un origen presináptico (Hao et al., 2009). La sumación espacial es un fenómeno que usualmente no es lineal y depende de las propiedades biofísicas intrínsecas de la membrana, especialmente de la τ_{memb} y de la inhibición perisomática proveniente de interneuronas GABAérgicas. Justamente, la inhibición GABAérgica restringe el margen temporal en que dos eventos sinápticos de diferente origen se sumen eficientemente para generar un potencial de acción en la neurona postsináptica (Pouille & Scanziani, 2001). Por otro lado, la sumación espacial permite la computación de eventos sinápticos sucesivos provenientes del mismo origen presináptico (Hao et al., 2009). Aunque por mucho tiempo se asumió que la sumación temporal es una propiedad eminentemente pasiva de las neuronas, se han reportado mecanismos iónicos que participan activamente en la modulación de la eficacia con que la sumación temporal ocurre, tanto en neuronas piramidales como en interneuronas del hipocampo y neocorteza (Carr et al., 2007; Carr & Surmeier, 2007). Este tipo de sumación, sin embargo, también depende de las propiedades pasivas de la membrana y de la inhibición GABAérgica que recibe la neurona postsináptica. En ese sentido, nosotros caracterizamos la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia a fin de evaluar si los cambios observados en la integración sináptica se asociaban a cambios en la excitabilidad. Aunque no hubo cambios significativos en el PMR, encontramos un incremento sistemático en la R_N y la τ_{memb} , así como una disminución en la I_{Rho} , señales inequívocas de un incremento en la excitabilidad celular. Ya que las propiedades pasivas de las membranas neuronales dependen de las propiedades biofísicas y la expresión funcional de conductancias activas cerca del PMR, tales como canales de K^+ de dominio de dos poros (K2P) y canales de K^+ de rectificación entrante (Kir) (Isomoto et al., 1997; Hibino et al., 2010). La disminución de estos canales conduce a un incremento en la excitabilidad neuronal, y viceversa (Lee and Jan, 2012; Griego et al., 2022). Consistente con este punto, la MIA altera la

expresión de los genes que codifican para canales K2P (Amodeo et al., 2019), y modifica la expresión funcional de canales Kir (Jeremic et al., 2021).

Además de estas alteraciones en las propiedades pasivas, encontramos un incremento significativo en parámetros cuantitativos del disparo (frecuencia, ganancia, offset, etc.) que confirman un incremento en la excitabilidad neuronal. En línea con nuestros hallazgos, otros grupos han demostrado que la MIA, inducida ya sea por LPS o por poly I:C, modifica la excitabilidad neuronal hipocampal (Pineda et al., 2013; Patrich et al., 2016; Fernandez et al., 2019). Un mecanismo iónico que subyace al fenómeno de hiperexcitabilidad inducido por MIA, es la expresión aumentada y/o actividad de canales de K^+ , particularmente canales de K^+ dependientes de voltaje de rápida inactivación, como los Kv1 y Kv4, responsables de las corrientes tipo D y A (I_{KD} e I_{KA} , respectivamente). En ese sentido, encontramos una menor I_{KA} en las neuronas piramidales de CA1 de ratones expuestos a MIA. La I_{KA} juega un papel preponderante en la regulación de la R_N , la frecuencia de disparo y la anatomía del potencial de acción (Kim et al., 2005; Griego et al., 2022). Además, la I_{KA} es un factor clave para determinar la eficacia de la integración dendrítica en las neuronas del hipocampo (Spruston, 2008). En estudios previos, hemos mostrado evidencia de que modificaciones en la expresión funcional de la I_{KA} conduce a cambios en la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 (Griego et al., 2022). Otros estudios demostraron que alteraciones en la expresión funcional de esta conductancia en diferentes tipos neuronales conduce a defectos en la inducción y expresión de diferentes formas de plasticidad funcional, como la plasticidad sináptica e intrínseca (Griego, Hernández-Frausto, et al., 2022; Johnston et al., 2003; J. Kim & Hoffman, 2008). Sin embargo, este es el primer trabajo que describe estas alteraciones en un modelo de MIA inducido por LPS.

8.2. La activación inmune materna altera la complejidad y geometría neuronal

Se ha discutido sobre los sustratos biofísicos que dan forma a la capacidad computacional de las neuronas; sin embargo, la geometría dendrítica y las características morfométricas neuronales también son factores que determinan la eficacia con la que la información sináptica se integra en el compartimento somatodendrítico de las neuronas piramidales de CA1 (Gulledge et al., 2005). En esta tesis se realizó un análisis morfométrico sistemático de las dendritas, y se encontró que las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo dorsal de animales expuestos a MIA tuvieron una menor complejidad en comparación con los animales control. Nuestros datos son consistentes con estudios previos que mostraron un menor desarrollo y complejidad dendrítica, así como reducción en el número y volumen de las espinas dendríticas en respuesta a la MIA (Baharnoori et al., 2009; Fernández de Cossío et al., 2017). Una reestructuración en la arquitectura dendrítica podría contribuir a los cambios en las propiedades pasivas encontradas en este trabajo, de acuerdo con la teoría de cable de Rall. En ese sentido, alteraciones morfológicas pueden tener resonancia en la excitabilidad e integración sináptica neuronal (Magee, 2000; Spruston, 2008; Komendantov & Ascoli, 2009). La disminución en el número dendritas y/o espinas dendríticas es un hallazgo recurrente en diferentes modelos de trastornos neuropsiquiátricos, como el TEA y la esquizofrenia, dado que la MIA se ha asociado con un riesgo a desarrollar tales trastornos, es viable hipotetizar que estas alteraciones sean sustrato biológico de los síntomas presentes en estas enfermedades. Ha sido sugerido que el desequilibrio inmune en el feto a consecuencia de la MIA, caracterizado por niveles anormales de citocinas pro- y antiinflamatorias, así como por otros componentes de la inmunidad como la activación de la microglía, sean los mecanismos detrás de las alteraciones en la morfología de las neuronas hipocampales y corticales (Pekala et al., 2021). Aunque en este trabajo no se exploraron los potenciales mecanismos moleculares que

subyacen al deterioro en la complejidad morfológica inducida por la MIA, es un tópico que demanda ser investigado dada su relevancia.

8.3. La activación inmune materna altera el equilibrio E-I y reduce la inhibición perisomática en la descendencia

La inhibición GABAérgica resulta fundamental para preservar el equilibrio sináptico y la homeostasis cerebral, y así lograr que el neurodesarrollo se conduzca con normalidad (Represa & Ben-Ari, 2005; D. D. Wang & Kriegstein, 2009). En ese sentido, al analizar la actividad sináptica espontánea, encontramos evidencias de que la MIA inducida por LPS altera el balance E-I en el cerebro neonatal, aumentando la excitación al mismo tiempo que disminuye la inhibición GABAérgica que inerva a las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia. Por si fuera poco, la inhibición GABAérgica perisomática dependiente de IN PV+ e IN CCK+ fue menor en los animales expuestos a MIA. En consecuencia, la integración sináptica estaría particularmente alterada en los dominios dendríticos proximales de las neuronas piramidales de CA1, dado que es ahí donde llegan las conexiones GABAérgicas procedentes de estas dos clases de interneuronas (Freund & Katona, 2007). La transmisión GABAérgica, los circuitos locales inhibidores y toda la maquinaria asociada a mantener el balance E-I maduran en las etapas prenatal y postnatal temprana (di Cristo, 2007; Lopatina et al., 2019). Los diferentes pasos en este proceso de maduración GABAérgica, incluida la migración de interneuronas y la consolidación de los circuitos GABAérgicos en el hipocampo y la corteza, son sensibles a las moléculas de la inmunidad innata, cuya liberación y actividad es estimulada tras la inducción de la MIA (Labouesse et al., 2015; Fernandez et al., 2019; Canales et al., 2021). Nuestros resultados están alineados con la hipótesis de que las alteraciones en la inhibición GABAérgica son una firma característica en modelos de trastornos neuropsiquiátricos en los cuales la corteza y el hipocampo están involucrados (Kolata et al., 2018; Marín, 2012). En conjunto, nuestros datos sugieren que los circuitos GABAérgicos locales en la región CA1 del hipocampo dorsal están mermados, lo cual, junto con las alteraciones en la

excitabilidad intrínseca y en la morfología neuronal, conduce a un estado de hiperexcitabilidad y pérdida en la fidelidad espaciotemporal de la integración sináptica. Estas alteraciones neurofisiológicas servirían como sustrato para las conductas alteradas que se han reportado en este modelo y otros modelos similares de MIA (; Simões et al., 2018; Bergdolt & Dunaevsky, 2019; Haida et al., 2019), así como en diferentes modelos de esquizofrenia y TEA. En todo caso, más experimentos son requeridos para dilucidar los mecanismos moleculares y epigenéticos involucrados en los fenómenos aquí descritos.

8.4. Ausencia de indicadores de neuroinflamación aguda en la descendencia

Ha sido reportado que diferentes moléculas asociadas a la respuesta inmune, como las citocinas y los elementos moleculares del sistema de complemento, ejercen cierta influencia en la fisiología del SNC. Por ejemplo, se ha visto que diferentes citocinas tienen la capacidad de alterar la expresión funcional y las propiedades biofísicas de canales iónicos dependientes de voltaje, afectando en consecuencia la excitabilidad y propiedades plásticas neuronales (Schäfers & Sorkin, 2008; Vezzani & Viviani, 2015). Así mismo, la estimulación del sistema inmune mediante la inoculación de sustancias antigénicas, como el LPS, a nivel sistémico, conduce a alteraciones en la fisiología cerebral (Griego et al., 2022). En ese sentido, dados los cambios en la excitabilidad intrínseca encontrados en este estudio, se esperaba que el cerebro de los ratones expuestos a MIA inducida por LPS mostraran patrones indicativos de neuroinflamación. Al analizar la densidad de células microgliales y astrocitos, no encontramos cambios significativos. Sin que se realizara un análisis morfológico sistemático, tampoco se encontraron alteraciones en la morfología de la microglía que sugiriera que estuviera en un estado reactivo. Por otro lado, el análisis cuantitativo de la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias mediante RT-qPCR tampoco reveló señales de un proceso neuroinflamatorio activo ni a la edad empleada para los experimentos de fisiología (28-35 PND) ni a una edad postnatal temprana (1 PND).

De hecho, al PND 1 encontramos una disminución en la expresión relativo de los genes evaluados (TNF- α , IL-1 β e IL-6). Lo anterior es indicativo de que la desregulación inmunológica en el organismo fetal inicia inmediatamente después de la inducción de la MIA y prevalece hasta los primeros días de vida postnatal, sin que ello implique necesariamente un estado neuroinflamatorio. En contraste, otros reportes han sugerido que las alteraciones en la expresión de citocinas y marcadores inflamatorios perduran hasta la edad juvenil, e incluso, hasta la edad adulta (Girard et al., 2010; Ratnayake et al., 2012). La explicación mecanística para tales discrepancias, así como para la comprensión de como tales alteraciones inmunes conducen a las perturbaciones neurofisiológicas y conductuales reportadas en este modelo requieren mayor investigación.

9. Conclusión

Los datos reportados en esta tesis nos permiten concluir que la administración sistémica de LPS obtenido de *Escherichia coli* del serotipo O26:B6 en ratonas gestantes de la cepa C57BL/6 induce una potente respuesta inmune que conduce a perturbaciones en el neurodesarrollo fetal, lo cual se refleja en alteraciones en el hipocampo dorsal, tanto a nivel anatómico como neurofisiológico. Como resultado, la descendencia de las ratonas inyectadas con LPS muestran una expresión funcional disminuida de múltiples canales iónicos, una mayor excitabilidad intrínseca y disparo de potenciales de acción, un desequilibrio en el balance E-I, y una menor complejidad en las arborizaciones dendríticas de las neuronas piramidales de CA1. Todo lo anterior se suma para generar una integración sináptica aberrante a nivel hipocampal, lo que puede ayudar a explicar los fenotipos conductuales que se han caracterizado en este modelo de daño en el neurodesarrollo.

Este estudio proporciona evidencia experimental que abona a nuestra comprensión de como insultos inflamatorios durante la gestación conllevan a un incremento en el riesgo de desarrollar trastornos neuropsiquiátricos en la descendencia.

10. Perspectivas

- θ Identificar los mecanismos moleculares que relacionan la desregulación inmune con las alteraciones morfológicas y biofísicas en las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia
- θ Explorar las subclases específicas de interneuronas GABAérgicas afectadas por la MIA, mediante el uso de tecnología de ingeniería genética.
- θ Una vez identificadas, explorar potenciales alteraciones moleculares, morfológicas, biofísicas y sinápticas en las interneuronas GABAérgicas alteradas.
- θ Explorar probables alteraciones en la plasticidad funcional de las neuronas piramidales de CA1 de la descendencia, en específico la plasticidad sináptica e intrínseca.
- θ Comparar este modelo de MIA inducida por antígenos bacterianos con otros modelos similares pero inducidos con antígenos virales. Así mismo, comparar las consecuencias en la descendencia cuando el evento inductor ocurre en otro momento del desarrollo fetal.

Referencias

- Amodeo, D. A., Lai, C.-Y., Hassan, O., Mukamel, E. A., Behrens, M. M., & Powell, S. B. (2019). Maternal immune activation impairs cognitive flexibility and alters transcription in frontal cortex. *Neurobiology of Disease*, *125*, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.01.025>
- Baharnoori, M., Brake, W. G., & Srivastava, L. K. (2009). Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophrenia Research*, *107*(1), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2008.10.003>
- Bergdolt, L., & Dunaevsky, A. (2019). Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Progress in Neurobiology*, *175*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>
- Biesmans, S., Matthews, L. J. R., Bouwknecht, J. A., de Haes, P., Hellings, N., Meert, T. F., Nuydens, R., & ver Donck, L. (2016). Systematic Analysis of the Cytokine and Anhedonia Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration in Rats. *BioMed Research International*, *2016*, 9085273. <https://doi.org/10.1155/2016/9085273>
- Bird, C. M., & Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(3), 182–194. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>
- Bliss, T. v., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Boato, F., Hechler, D., Rosenberger, K., Lüdecke, D., Peters, E. M., Nitsch, R., & Hendrix, S. (2011). Interleukin-1 beta and neurotrophin-3 synergistically promote neurite growth in vitro. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 183. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-183>
- Booth, C. A., Brown, J. T., & Randall, A. D. (2014). Neurophysiological modification of CA1 pyramidal neurons in a transgenic mouse expressing a truncated form of

- disrupted-in-schizophrenia 1. *The European Journal of Neuroscience*, 39(7), 1074–1090. <https://doi.org/10.1111/ejn.12549>
- Borde, M., Cazalets, J. R., & Buño, W. (1995). Activity-dependent response depression in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 74(4), 1714–1729. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.4.1714>
- Borsini, A., Zunszain, P. A., Thuret, S., & Pariante, C. M. (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, 38(3), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.006>
- Boulanger-Bertolus, J., Pancaro, C., & Mashour, G. A. (2018). Increasing Role of Maternal Immune Activation in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 230. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00230>
- Brown, A. S., & Meyer, U. (2018). Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Illness: A Translational Research Perspective. *The American Journal of Psychiatry*, 175(11), 1073–1083. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.17121311>
- Brynskikh, A., Warren, T., Zhu, J., & Kipnis, J. (2008). Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(6), 861–869. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.12.008>
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- Canales, C. P., Estes, M. L., Cichewicz, K., Angara, K., Aboubechara, J. P., Cameron, S., Prendergast, K., Su-Feher, L., Zdilar, I., Kreun, E. J., Connolly, E. C., Seo, J. M., Goon, J. B., Farrelly, K., Stradleigh, T. W., van der List, D., Haapanen, L., van de Water, J., Vogt, D., ... Nord, A. S. (2021). Sequential perturbations to mouse corticogenesis following in utero maternal immune activation. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.60100>
- Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L. J., Sahn, R., Harrison, N. L., Gordon, J. A., Brown, A., & Kellendonk, C. (2016). Maternal immune activation leads

- to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Molecular Psychiatry*, 21(7), 956–968. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.222>
- Carr, D. B., Andrews, G. D., Glen, W. B., & Lavin, A. (2007). alpha2-Noradrenergic receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *The Journal of Physiology*, 584(Pt 2), 437–450. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.141671>
- Carr, D. B., & Surmeier, D. J. (2007). M1 muscarinic receptor modulation of Kir2 channels enhances temporal summation of excitatory synaptic potentials in prefrontal cortex pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 97(5), 3432–3438. <https://doi.org/10.1152/jn.00828.2006>
- Chen, C.-Y., Shih, Y.-C., Hung, Y.-F., & Hsueh, Y.-P. (2019). Beyond defense: regulation of neuronal morphogenesis and brain functions via Toll-like receptors. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0584-z>
- Chitwood, R. A., Hubbard, A., & Jaffe, D. B. (1999). Passive electrotonic properties of rat hippocampal CA3 interneurons [In Process Citation]. *J Physiol (Lond)*, 515(Pt 3), 743–756. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.journals.cup.org/owa_dba/owa/approval%3Fsjid=PHY&said=8686&spii=S002237519908686X
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. v., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., & Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276), 933–939. <https://doi.org/10.1126/science.aad0314>
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(5), 311–321. <https://doi.org/10.1038/nrn3484>
- Cowan, M., & Petri, W. A. (2018). Microglia: Immune Regulators of Neurodevelopment. *Frontiers in Immunology*, 9, 2576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02576>
- Daumas, S., Halley, H., Francés, B., & Lassalle, J.-M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1

- hippocampal subregions. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(4), 375–382. <https://doi.org/10.1101/lm.81905>
- Deverman, B. E., & Patterson, P. H. (2009). Cytokines and CNS development. *Neuron*, 64(1), 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>
- di Cristo, G. (2007). Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clinical Genetics*, 72(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00822.x>
- Dickerson, D. D., Wolff, A. R., & Bilkey, D. K. (2010). Abnormal long-range neural synchrony in a maternal immune activation animal model of schizophrenia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(37), 12424–12431. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3046-10.2010>
- Drake, C. T., & Milner, T. A. (2002). Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. *Hippocampus*, 12(2), 119–136. <https://doi.org/10.1002/hipo.1107>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353(6301), 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
- Farovik, A., Dupont, L. M., & Eichenbaum, H. (2010). Distinct roles for dorsal CA3 and CA1 in memory for sequential nonspatial events. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(1), 12–17. <https://doi.org/10.1101/lm.1616209>
- Fernandez, A., Dumon, C., Guimond, D., Tyzio, R., Bonifazi, P., Lozovaya, N., Burnashev, N., Ferrari, D. C., & Ben-Ari, Y. (2019). The GABA Developmental Shift Is Abolished by Maternal Immune Activation Already at Birth. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 29(9), 3982–3992. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy279>
- Fernández de Cossío, L., Guzmán, A., van der Veldt, S., & Luheshi, G. N. (2017). Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 63, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.09.028>

- Forsythe, P. (2019). Mast Cells in Neuroimmune Interactions. *Trends in Neurosciences*, 42(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.006>
- Freund, T. F., & Katona, I. (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron*, 56(1), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.012>
- Fuenzalida, M., Fernandez de Sevilla, D., & Buño, W. (2007). Changes of the EPSP waveform regulate the temporal window for spike-timing-dependent plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(44), 11940–11948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0900-07.2007>
- Garden, D. L. F., Dodson, P. D., O'Donnell, C., White, M. D., & Nolan, M. F. (2008). Tuning of synaptic integration in the medial entorhinal cortex to the organization of grid cell firing fields. *Neuron*, 60(5), 875–889. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.044>
- Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., & Sébire, G. (2010). IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(7), 3997–4005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903349>
- Griego, E., Hernández-Frausto, M., Márquez, L. A., Lara-Valderrabano, L., López Rubalcava, C., & Galván, E. J. (2022). Activation of D1/D5 receptors ameliorates decreased intrinsic excitability of hippocampal neurons induced by neonatal blockade of N-methyl-d-aspartate receptors. *British Journal of Pharmacology*, 179(8), 1695–1715. <https://doi.org/10.1111/bph.15735>
- Griego, E., Herrera-López, G., Gómez-Lira, G., Barrionuevo, G., Gutiérrez, R., & Galván, E. J. (2021). Functional expression of TrkB receptors on interneurons and pyramidal cells of area CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 182, 108379. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108379>
- Griego, E., Santiago-Jiménez, G., & Galván, E. J. (2022). Systemic administration of lipopolysaccharide induces hyperexcitability of prelimbic neurons via modulation of sodium and potassium currents. *Neurotoxicology*, 91, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.05.010>

- Gu, N., Vervaeke, K., & Storm, J. F. (2007). BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, *580*(Pt.3), 859–882. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.126367>
- Gulledge, A. T., Kampa, B. M., & Stuart, G. J. (2005). Synaptic integration in dendritic trees. *Journal of Neurobiology*, *64*(1), 75–90. <https://doi.org/10.1002/neu.20144>
- Gumusoglu, S. B., Fine, R. S., Murray, S. J., Bittle, J. L., & Stevens, H. E. (2017). The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, *65*, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.05.015>
- Haddad, F. L., Patel, S. v., & Schmid, S. (2020). Maternal Immune Activation by Poly I:C as a preclinical Model for Neurodevelopmental Disorders: A focus on Autism and Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *113*, 546–567. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.012>
- Haida, O., al Sagheer, T., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Soria, F., Fernagut, P. O., & Jaber, M. (2019). Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Translational Psychiatry*, *9*(1), 124. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0457-y>
- Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., & Dale, R. C. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews. Neurology*, *17*(9), 564–579. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00530-8>
- Hao, J., Wang, X., Dan, Y., Poo, M., & Zhang, X. (2009). An arithmetic rule for spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(51), 21906–21911. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912022106>
- Häusser, M., & Clark, B. A. (1997). Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron*, *19*(3), 665–678. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80379-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80379-7)
- Heifets, B. D., Chevaleyre, V., & Castillo, P. E. (2008). Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10250–10255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711880105>
- Herrera-López, G., & Galván, E. J. (2018). Modulation of hippocampal excitability via the hydroxycarboxylic acid receptor 1. *Hippocampus*, 28(8), 557–567. <https://doi.org/10.1002/hipo.22958>
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews*, 90(1), 291–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Hoffman, A. F., & Lupica, C. R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), 2470–2479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729327>
- Hoffman, G. E., Murphy, K. J., & Sita, L. v. (2016). The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical Methods. *Current Protocols in Neuroscience*, 76, 2.12.1-2.12.37. <https://doi.org/10.1002/cpns.1>
- Hung, Y.-F., Chen, C.-Y., Shih, Y.-C., Liu, H.-Y., Huang, C.-M., & Hsueh, Y.-P. (2018). Endosomal TLR3, TLR7, and TLR8 control neuronal morphology through different transcriptional programs. *The Journal of Cell Biology*, 217(8), 2727–2742. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712113>
- Irie, F., & Yamaguchi, Y. (2004). EPHB receptor signaling in dendritic spine development. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, 1365–1373. <https://doi.org/10.2741/1325>
- Isomoto, S., Kondo, C., & Kurachi, Y. (1997). Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *The Japanese Journal of Physiology*, 47(1), 11–39. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.47.11>
- Jeremic, D., Sanchez-Rodriguez, I., Jimenez-Diaz, L., & Navarro-Lopez, J. D. (2021). Therapeutic potential of targeting G protein-gated inwardly rectifying potassium

- (GIRK) channels in the central nervous system. *Pharmacology & Therapeutics*, 223, 107808. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107808>
- Johnston, D., Christie, B. R., Frick, A., Gray, R., Hoffman, D. A., Schexnayder, L. K., Watanabe, S., & Yuan, L.-L. (2003). Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1432), 667–674. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1248>
- Johnston, D., Hoffman, D. A., Magee, J. C., Poolos, N. P., Watanabe, S., Colbert, C. M., & Migliore, M. (2000). Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 525 Pt 1, 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00075.x>
- Kaul, D., Habel, P., Derkow, K., Krüger, C., Franzoni, E., Wulczyn, F. G., Bereswill, S., Nitsch, R., Schott, E., Veh, R., Naumann, T., & Lehnardt, S. (2012). Expression of Toll-like receptors in the developing brain. *PloS One*, 7(5), e37767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037767>
- Kawakami, Y., Sielski, R., & Kawakami, T. (2018). Mouse Body Temperature Measurement Using Infrared Thermometer During Passive Systemic Anaphylaxis and Food Allergy Evaluation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 139. <https://doi.org/10.3791/58391>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 44. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00044>
- Kim, J., & Hoffman, D. A. (2008). Potassium channels: newly found players in synaptic plasticity. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 14(3), 276–286. <https://doi.org/10.1177/1073858408315041>
- Kim, J., Wei, D.-S., & Hoffman, D. A. (2005). Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *The Journal of Physiology*, 569(Pt 1), 41–57. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095042>
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 302–313. <https://doi.org/10.1002/jnr.20562>

- Knierim, J. J., & Neunuebel, J. P. (2016). Tracking the flow of hippocampal computation: Pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiology of Learning and Memory*, 129, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.10.008>
- Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., Toovey, S., & Prinssen, E. P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 10(11), 643–660. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187>
- Kolata, S. M., Nakao, K., Jeevakumar, V., Farmer-Alroth, E. L., Fujita, Y., Bartley, A. F., Jiang, S. Z., Rompala, G. R., Sorge, R. E., Jimenez, D. v, Martinowich, K., Mateo, Y., Hashimoto, K., Dobrunz, L. E., & Nakazawa, K. (2018). Neuropsychiatric Phenotypes Produced by GABA Reduction in Mouse Cortex and Hippocampus. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(6), 1445–1456. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.296>
- Komendantov, A. O., & Ascoli, G. A. (2009). Dendritic excitability and neuronal morphology as determinants of synaptic efficacy. *Journal of Neurophysiology*, 101(4), 1847–1866. <https://doi.org/10.1152/jn.01235.2007>
- Krook-Magnuson, E., Luu, L., Lee, S.-H., Varga, C., & Soltesz, I. (2011). Ivy and neurogliaform interneurons are a major target of μ -opioid receptor modulation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(42), 14861–14870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2269-11.2011>
- Labouesse, M. A., Dong, E., Grayson, D. R., Guidotti, A., & Meyer, U. (2015). Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics*, 10(12), 1143–1155. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1114202>
- Lenz, K. M., & Nelson, L. H. (2018). Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Frontiers in Immunology*, 9, 698. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00698>

- Lisman, J. E. (1999). Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron*, *22*(2), 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81085-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81085-5)
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopatina, O. L., Malinovskaya, N. A., Komleva, Y. K., Gorina, Y. v, Shuvaev, A. N., Olovyannikova, R. Y., Belozor, O. S., Belova, O. A., Higashida, H., & Salmina, A. B. (2019). Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Reviews in the Neurosciences*, *30*(8), 807–820. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0014>
- Lorincz, A., & Nusser, Z. (2010). Molecular identity of dendritic voltage-gated sodium channels. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5980), 906–909. <https://doi.org/10.1126/science.1187958>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Magee, J. C. (2000). Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature Reviews. Neuroscience*, *1*(3), 181–190. <https://doi.org/10.1038/35044552>
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(2), 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, *102*(3), 527–540. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00496-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00496-6)
- Milior, G., di Castro, M. A., Sciarria, L. P., Garofalo, S., Branchi, I., Ragozzino, D., Limatola, C., & Maggi, L. (2016). Electrophysiological Properties of CA1 Pyramidal Neurons along the Longitudinal Axis of the Mouse Hippocampus. *Scientific Reports*, *6*, 38242. <https://doi.org/10.1038/srep38242>

- Minakova, E., & Warner, B. B. (2018). Maternal immune activation, central nervous system development and behavioral phenotypes. *Birth Defects Research*, *110*(20), 1539–1550. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1416>
- Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, *8*(3), 227–241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Monday, H. R., Bourdenx, M., Jordan, B. A., & Castillo, P. E. (2020). CB1-receptor-mediated inhibitory LTD triggers presynaptic remodeling via protein synthesis and ubiquitination. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.54812>
- Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A.-L., Evrard, P., Gressens, P., & Verney, C. (2007). Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *66*(5), 372–382. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180517b46>
- Neu, A., Földy, C., & Soltesz, I. (2007). Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystokinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, *578*(Pt 1), 233–247. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115691>
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, *64*, 313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
- Nolan, A. M., Nolan, Y. M., & O’Keeffe, G. W. (2011). IL-1 β inhibits axonal growth of developing sympathetic neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *48*(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.07.003>
- Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S. M., Griffioen, K. J., Roberts, N., Castro, K., Mughal, M. R., Pita, M. A., Stranahan, A. M., Arumugam, T. v., & Mattson, M. P. (2012). Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory. *PloS One*, *7*(10), e47522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047522>
- Okun, E., Griffioen, K., Barak, B., Roberts, N. J., Castro, K., Pita, M. A., Cheng, A., Mughal, M. R., Wan, R., Ashery, U., & Mattson, M. P. (2010). Toll-like receptor 3

- inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(35), 15625–15630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005807107>
- Oskvig, D. B., Elkahloun, A. G., Johnson, K. R., Phillips, T. M., & Herkenham, M. (2012). Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(4), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.015>
- Parker-Athill, E. C., & Tan, J. (2010). Maternal immune activation and autism spectrum disorder: interleukin-6 signaling as a key mechanistic pathway. *Neuro-Signals*, *18*(2), 113–128. <https://doi.org/10.1159/000319828>
- Patrich, E., Piontkewitz, Y., Peretz, A., Weiner, I., & Attali, B. (2016). Maternal immune activation produces neonatal excitability defects in offspring hippocampal neurons from pregnant rats treated with poly I:C. *Scientific Reports*, *6*, 19106. <https://doi.org/10.1038/srep19106>
- Patterson, P. H. (2011). Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(7), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001>
- Pekala, M., Doliwa, M., & Kalita, K. (2021). Impact of maternal immune activation on dendritic spine development. *Developmental Neurobiology*, *81*(5), 524–545. <https://doi.org/10.1002/dneu.22804>
- Petrelli, F., Pucci, L., & Bezzi, P. (2016). Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*, 21. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00021>
- Pettit, D. L., & Augustine, G. J. (2000). Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *Journal of Neurophysiology*, *84*(1), 28–38. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.28>
- Pineda, E., Shin, D., You, S. J., Auvin, S., Sankar, R., & Mazarati, A. (2013). Maternal immune activation promotes hippocampal kindling epileptogenesis in mice. *Annals of Neurology*, *74*(1), 11–19. <https://doi.org/10.1002/ana.23898>

- Pont-Lezica, L., Béchade, C., Belarif-Cantaut, Y., Pascual, O., & Bessis, A. (2011). Physiological roles of microglia during development. *Journal of Neurochemistry*, *119*(5), 901–908. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07504.x>
- Pouille, F., & Scanziani, M. (2001a). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by feed-forward somatic inhibition. *Science*, *293*(5532), 325–331. <https://doi.org/10.1126/science.1060342>
- Pouille, F., & Scanziani, M. (2001b). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5532), 1159–1163. <https://doi.org/10.1126/science.1060342>
- Pouille, F., & Scanziani, M. (2004). Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature*, *429*(6993), 717–723. <https://doi.org/10.1038/nature02615>
- Rall, W. (1969). Distributions of potential in cylindrical coordinates and time constants for a membrane cylinder. *Biophysical Journal*, *9*(12), 1509–1541. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(69\)86468-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(69)86468-4)
- Ratnayake, U., Quinn, T. A., Castillo-Melendez, M., Dickinson, H., & Walker, D. W. (2012). Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I:C at mid-pregnancy. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(8), 1288–1299. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.08.011>
- Ratnayake, U., Quinn, T., Walker, D. W., & Dickinson, H. (2013). Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. *Frontiers in Neuroscience*, *7*, 180. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00180>
- Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., & Pollak, D. D. (2015). The poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, *149*, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.001>
- Remondes, M., & Schuman, E. M. (2004). Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature*, *431*(7009), 699–703. <https://doi.org/10.1038/nature02965>

- Represa, A., & Ben-Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends in Neurosciences*, *28*(6), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.010>
- Ritchie, L., Tate, R., Chamberlain, L. H., Robertson, G., Zagnoni, M., Sposito, T., Wray, S., Wright, J. A., Bryant, C. E., Gay, N. J., & Bushell, T. J. (2018). Toll-like receptor 3 activation impairs excitability and synaptic activity via TRIF signalling in immature rat and human neurons. *Neuropharmacology*, *135*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.025>
- Routh, B. N., Johnston, D., Harris, K., & Chitwood, R. A. (2009). Anatomical and electrophysiological comparison of CA1 pyramidal neurons of the rat and mouse. *Journal of Neurophysiology*, *102*(4), 2288–2302. <https://doi.org/10.1152/jn.00082.2009>
- Savanthrapadian, S., Wolff, A. R., Logan, B. J., Eckert, M. J., Bilkey, D. K., & Abraham, W. C. (2013). Enhanced hippocampal neuronal excitability and LTP persistence associated with reduced behavioral flexibility in the maternal immune activation model of schizophrenia. *Hippocampus*, *23*(12), 1395–1409. <https://doi.org/10.1002/hipo.22193>
- Schäfers, M., & Sorkin, L. (2008). Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neuroscience Letters*, *437*(3), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.052>
- Scott, L. L., Mathews, P. J., & Golding, N. L. (2010). Perisomatic voltage-gated sodium channels actively maintain linear synaptic integration in principal neurons of the medial superior olive. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(6), 2039–2050. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2385-09.2010>
- Shao, C., Chen, P., Chen, Q., Zhao, M., Zhang, W.-N., & Yang, K. (2020). Mu opioid receptors inhibit GABA release from parvalbumin interneuron terminals onto CA1 pyramidal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *522*(4), 1059–1062. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.013>
- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*, *4*(5), E131-6. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>

- Silver, R., & Curley, J. P. (2013). Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends in Neurosciences*, *36*(9), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.06.001>
- Simões, L. R., Sangiogo, G., Tashiro, M. H., Generoso, J. S., Faller, C. J., Dominguni, D., Mastella, G. A., Scaini, G., Giridharan, V. V., Michels, M., Florentino, D., Petronilho, F., Réus, G. Z., Dal-Pizzol, F., Zugno, A. I., & Barichello, T. (2018). Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. *Journal of Psychiatric Research*, *100*, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.02.007>
- Solek, C. M., Farooqi, N., Verly, M., Lim, T. K., & Ruthazer, E. S. (2018). Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *247*(4), 588–619. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24612>
- Sominsky, L., de Luca, S., & Spencer, S. J. (2018). Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *94*, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.11.012>
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(3), 206–221. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>
- Spruston, N., Jaffe, D. B., & Johnston, D. (1994). Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends in Neurosciences*, *17*(4), 161–166. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90094-9)
- Storm, J. F. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Progress in Brain Research*, *83*, 161–187. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61248-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61248-0)
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). Microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science*, *34*(2), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.10.002>
- Tamminga, C. A., Thomas, B. P., Chin, R., Mihalakos, P., Youens, K., Wagner, A. D., & Preston, A. R. (2012). Hippocampal novelty activations in schizophrenia: disease and medication effects. *Schizophrenia Research*, *138*(2–3), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.03.019>

- Tanabe, S., & Yamashita, T. (2018). The role of immune cells in brain development and neurodevelopmental diseases. *International Immunology*, *30*(10), 437–444. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy041>
- Tsou, K., Mackie, K., Sañudo-Peña, M. C., & Walker, J. M. (1999). Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, *93*(3), 969–975. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00086-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00086-x)
- Valle-Bautista, R., Márquez-Valadez, B., Fragoso-Cabrera, A. D., García-López, G., Díaz, N. F., Herrera-López, G., Griego, E., Galván, E. J., Arias-Montaño, J.-A., & Molina-Hernández, A. (2020). Impaired Cortical Cytoarchitecture and Reduced Excitability of Deep-Layer Neurons in the Offspring of Diabetic Rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 564561. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564561>
- 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>
- Vezzani, A., & Viviani, B. (2015). Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, *96*(Pt A), 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.027>
- Villanueva-Castillo, C., Tecuatl, C., Herrera-López, G., & Galván, E. J. (2017). Aging-related impairments of hippocampal mossy fibers synapses on CA3 pyramidal cells. *Neurobiology of Aging*, *49*, 119–137. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.010>
- Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2009). Defining the role of GABA in cortical development. *The Journal of Physiology*, *587*(Pt 9), 1873–1879. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167635>
- Wang, X., Fu, S., Wang, Y., Yu, P., Hu, J., Gu, W., Xu, X.-M., & Lu, P. (2007). Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells

through the activation of SAPK/JNK pathway. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 36(3), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.07.005>

Weir, R. K., Forghany, R., Smith, S. E. P., Patterson, P. H., McAllister, A. K., Schumann, C. M., & Bauman, M. D. (2015). Preliminary evidence of neuropathology in nonhuman primates prenatally exposed to maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.009>

Zengeler, K. E., & Lukens, J. R. (2021). Innate immunity at the crossroads of healthy brain maturation and neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews. Immunology*, 21(7), 454–468. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00487-7>

Zunszain, P. A., Anacker, C., Cattaneo, A., Choudhury, S., Musaelyan, K., Myint, A. M., Thuret, S., Price, J., & Pariante, C. M. (2012). Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(4), 939–949. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.277>