



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y
Biomedicina (CICSaB)**



**ALTERACIONES COLINÉRGICAS EN EL SISTEMA
NERVIOSO ENTÉRICO EN UN MODELO DE AUTISMO**

TESIS QUE PRESENTA

Ulises Quiroz Alamilla

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

CO-DIRECTORES DE TESIS

Paola Algara Suárez

Oswaldo Ibáñez Sandoval

Febrero 2023

Créditos Institucionales

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología Conductual y Cognitiva que pertenece al Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la dirección del Dr. Osvaldo Ibáñez Sandoval y la Dra. Paola Algara Suárez. Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca no. 927961 a Ulises Quiroz Alamilla. Así también el apoyo otorgado por la UASLP mediante el Fondo de Apoyo a la Investigación al proyecto "Alteraciones Colinérgicas del Músculo Liso Gastrointestinal en un Modelo de Autismo" C17-FAI-06-36.36.

Tesis que presenta

Ulises Quiroz Alamilla

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biomédicas Básicas

CO-DIRECTORES DE TESIS

Paola Algara Suárez

Osvaldo Ibáñez Sandoval

ASESORES

Ricardo Espinosa Tanguma

Nadia Saderi

María Guadalupe Martel Gallegos

JURADO

Presidente: Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado

Secretaria sinodal: Dra. Nadia Saderi

Sinodal: Dr. Ricardo Espinosa Tanguma

Sinodal: Dra. María Guadalupe Martel Gallegos

Sinodal suplente: Dra. Mónica Calera



Alteraciones Colinérgicas en el Sistema Nervioso Entérico en un Modelo de Autismo por Ulises Quiroz Alamilla está bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Agradecimientos

A mi mamá, por ser mi mamá.

Y por ser siempre el viento bajo mis alas.

-

A toda mi familia, gracias por nunca soltarme.

Lo que soy, lo soy gracias a ustedes.

-

A mis amigos y amigas

Han sido soporte, compañía, paño de lágrimas,

tesoro de consejos y fuente interminable de risas: El combustible de este viaje.

¡Qué bonito coincidir!

-

Al doctor Osvaldo y la doctora Paola

Por que además de asesorarme, me enseñaron a pensar

de una manera que no conocía y me han dado,

además de conocimientos, su apoyo.

-

Al doctor Ricardo

por abrirme sus puertas, desde el inicio y siempre.

-

A la doctora Lupita y la doctora Nadia

por sus consejos y asesoría, pero sobre todo por darme su tiempo.

-

Al doctor Roberto Valle.

Un honor para mí trabajar y aprender con Usted pero, sobre todo,

un gusto.

-

A todo el departamento de Fisiología, por siempre empujarme a saber más.

Dare mighty things.

Alteraciones Colinérgicas en el Sistema Nervioso Entérico en un Modelo de Autismo

Ulises Quiroz Alamilla
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Febrero 2023

Índice		3. Resultados	15
		3.1. Pruebas conductuales . . .	15
1. Introducción	4	3.2. Tensión isométrica	15
1.1. Sistema Nervioso Entérico	6	3.3. Western-Blot	17
1.2. Modelo animal	7		
2. Materiales y Métodos	8	4. Discusión	18
2.1. Pruebas conductuales . .	9	5. Conclusión	22
2.2. Tensión isométrica	11		
2.3. Western-Blot	13	6. Figuras	24

Resumen

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es una alteración del neurodesarrollo con presentación clínica heterogénea, principalmente relacionada con déficits en la comunicación e interacción social. Se relaciona su aparición a diversos factores, entre ellos la exposición prenatal a sustancias teratógenas. El cuadro clínico frecuentemente se presenta con diversas comorbilidades, destacando por su prevalencia una variedad de síntomas gastrointestinales, cuyo origen no ha sido explicado hasta el momento. La finalidad de este trabajo fue conocer si existen alteraciones funcionales en el sistema nervioso entérico (SNE) de un modelo animal del TEA basado en la exposición prenatal de ratas al ácido valproico (AVP), así como explorar la expresión proteica del principal receptor implicado en la señalización motora del SNE: el receptor muscarínico tipo 3 (M3R). Tras reproducir el modelo y observar las alteraciones características del TEA, se realizaron experimentos farmacológicos donde se encontraron diferencias en la sensibilidad a fármacos agonistas y antagonistas de la acetilcolina. Al evaluar la expresión proteica del receptor M3, encontramos un patrón de bandedo distinto en las ratas del modelo con respecto a las ratas control, lo que puede sugerir cambios en la oligomerización de este último. Las diferencias que fueron encontradas entre la respuesta motora y la expresión del receptor M3 pueden tener relación con una respuesta alterada a la señal colinérgica, lo que abre la puerta a una explicación para la sintomatología gastrointestinal prevalente en el TEA.

1. Introducción

Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un término usado para describir una constelación de signos y síntomas, relacionados todos con un neurodesarrollo anormal. Tiene una presentación heterogénea, sin embargo, se pueden considerar ciertas características como esenciales para su diagnóstico: los pacientes presentan una discapacidad permanente en la comunicación e interacción social, además de patrones restringidos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades. Estas particularidades se presentan desde la niñez temprana y limitan el funcionamiento diario del paciente¹.

Los intentos de reconocer al TEA como una entidad clínica única vienen desde el siglo XV², aunque no se le denominó 'autismo' sino hasta la década de los 40s³. Actualmente, se reconoce que el TEA es un padecimiento que posee un espectro amplio de presentaciones clínicas, con manifestaciones que van desde alteraciones muy leves del comportamiento y la comunicación, hasta deficiencias sensoriales e intelectuales severas que requieren de intervenciones permanentes por parte de los cuidadores⁴. Esta heterogeneidad ha complicado el estudio de esta enfermedad, así como su diagnóstico. Sin embargo, en tiempos recientes se ha reconocido el papel que varios factores de riesgo juegan como contribuyentes a la aparición del trastorno. Una característica recientemente reconocida del TEA es que su diagnóstico, aunque preferentemente hecho durante los primeros años de vida, puede ser realizado incluso en la edad adulta temprana, puesto que se conoce ahora que algunas características del mismo pueden no volverse notorias hasta que las exigencias sociales en la vida del paciente exceden sus capacidades⁵.

Epidemiología. La prevalencia del TEA se calcula a nivel global en 1 de cada 132 personas (7.6 por cada 1000)⁶; en países desarrollados es alrededor de 60 por cada 10,000⁷. Los niños se ven más afectados que las niñas por este trastorno, en una razón media de 4.3:1⁷, aunque se ha encontrado que la variabilidad de esta cifra es alta, llegando otros investigadores a calcular una relación de 3:1⁸.

Datos del 2018⁹ señalan que en México existen alrededor de 5.5 millones de personas con trastornos del desarrollo intelectual, entre los cuales se encuentra el TEA. En un estudio de 2016, en la ciudad de León, Guanajuato, se estimó la prevalencia entre niños de ocho años en 0.87 % [95 % CI (0.62-1.1)]¹⁰.

Etiología. La etiología del autismo es compleja, multifactorial y heterogénea. En el pasado se ha intentado encontrar una teoría unificada acerca del origen del autismo, con poco éxito. Esta falta de una causa única para el trastorno ha llevado a generar la hipótesis de que, en lugar de una etiología singular, el autismo se puede originar por varias vías y, por consecuencia, con diversos factores de riesgo, dando como resultado la presentación heterogénea observada¹¹. En general, actualmente se entiende que el TEA es el resultado de alteraciones en el desarrollo cerebral temprano y en la organización y conectividad neuronal. Presenta un componente genético importante, encontrándose una amplia variedad de genes asociados a su aparición, sin embargo, ningún locus es responsable de más del 1 % de los casos¹². Además de esto, se asocia a diversos factores ambientales, principalmente intrauterinos¹². De estos, se ha encontrado una asociación fuerte del TEA con complicaciones perinatales asociadas a isquemia o hipoxia cerebral¹³, así como con la exposición in utero a algunas sustancias teratógenas, como el ácido valproico (AVP)¹⁴.

Comorbilidades. Existen diversas condiciones comórbidas asociadas al TEA, que complican aún más el diagnóstico clínico. Las manifestaciones secundarias que más comúnmente se presentan son de origen neurológico, como epilepsia o alteraciones del sueño de etiología psiquiátrica, tales como trastornos de ansiedad, del ánimo o agresividad¹⁵. El 70 % de los pacientes presenta una única comorbilidad psiquiátrica y el 41 % tienen dos o más¹⁵.

De mayor frecuencia en su presentación, encontramos la fobia social, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), los trastornos de ansiedad, el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), síndrome de Tourette, desórdenes del sueño, trastornos de procesamiento sensorial, discapacidad intelectual², así como sintomatología gastrointestinal diversa.

Trastornos Gastrointestinales. Leo Kanner³ reportó que 6 de los 10 niños autistas que estudió presentaron 'dificultades severas para la alimentación desde el inicio de la vida'. Desde entonces, se ha encontrado un aumento en la prevalencia de síntomas gastrointestinales en pacientes con TEA¹⁶, sin que esta relación se haya estudiado a fondo hasta tiempos recientes. Uno de los primeros trabajos que evaluaron estos síntomas, reportó hallazgos histológicos compatibles con inflamación de la mucosa intestinal en 70 % de los pacientes estudiados¹⁷.

Estudios más recientes reportan una prevalencia de síntomas de 37 %¹⁸. Se ha reportado también que los niños con autismo pueden ser hasta 7 veces más propensos

que los niños sin discapacidades intelectuales a presentar diarrea o colitis frecuente¹⁹.

Los síntomas gastrointestinales que se reportan en la población con TEA son variados, siendo de presentación más frecuente los siguientes²⁰:

- Estreñimiento
- Dolor abdominal
- Reflujo
- Vómito
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Intolerancia a alimentos
- Meteorismo

La prevalencia reportada para estas características de la enfermedad suele variar considerablemente dependiendo de la población estudiada y la metodología del trabajo en cuestión. Además, cabe destacar que es muy frecuente que los pacientes con TEA presenten un comportamiento alimenticio atípico, caracterizado comúnmente por una hipersensibilidad en los alimentos y rigidez en su selección, lo que puede propiciar por sí mismo la aparición de algunos de estos síntomas²¹ o confundir su diagnóstico.

1.1. Sistema Nervioso Entérico

La actividad del tracto gastrointestinal es controlada por el sistema nervioso entérico (SNE). El SNE es la división más grande del sistema nervioso autónomo, contiene en total de 400 a 600 millones de neuronas (cercano al número total de neuronas en la médula espinal)²². El circuito integrador presente en esta red es capaz de controlar de manera autónoma los patrones de motilidad gastrointestinal, el intercambio de fluidos a través de la mucosa, así como la irrigación sanguínea local y la comunicación con el sistema inmune y endócrino del intestino²³. En los mamíferos monogástricos, el SNE se compone de agregados de cuerpos neuronales llamados ganglios entéricos, que forman estructuras (llamadas plexos) interconectadas e interdependientes: el plexo submucoso y el plexo mientérico²².

Motilidad. En el SNE actúan una variedad de neurotransmisores, siendo la acetilcolina (ACh) el más importante para la motilidad²⁴. La primera vez que se documentó que las neuronas que inervan el intestino liberan ACh fue en 1936²⁵; este trabajo fue seguido por otros que demostraron la presencia de colina acetiltransferasa (ChAT), la enzima que sintetiza ACh y su localización en las neuronas excitatorias del músculo liso intestinal²⁶.

En el SNE se encuentran receptores colinérgicos de tipo nicotínico y muscarínico; mientras que los receptores nicotínicos median la transmisión rápida de reflejos y la respuesta a estímulos, los receptores muscarínicos se asocian a la transmisión final entre las motoneuronas y el músculo liso. La ACh liberada en el SNE puede provenir de estímulos intrínsecos (reflejos) o del sistema nervioso central (SNC), por medio de la acción parasimpática del nervio vago²⁷.

Receptores muscarínicos. Dentro del SNE se expresan principalmente los receptores M1r, M2r y M3r, el primero y el último de estos, mediante su acople a una proteína G_q/G_{11} , estimulan la actividad de fosfolipasa C, generando los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), quienes inducen la salida de calcio de las reservas intracelulares y la entrada de calcio extracelular, respectivamente. M2r acoplado a G_i/G_o , inhibe la actividad de adenilato ciclasa (AC) lo que a su vez reduce los niveles de AMP cíclico (cAMP) y disminuye su acción inhibitoria sobre la contracción muscular^{28,29}.

A pesar de que la expresión intestinal de M2r es mayor que la de M3r, éstos últimos son los mediadores principales de la contracción muscular²⁴ debido a su acción sobre los niveles de calcio intracelular.

1.2. Modelo animal

El AVP es utilizado como antiepiléptico y estabilizador del ánimo³⁰. Además se ha descrito que modula la neurotransmisión y la expresión génica, inhibiendo la desacetilasa de histonas (HDAC)³¹. La exposición in utero al AVP está relacionada con defectos de cierre del tubo neural, retraso en el crecimiento y TEA; del mismo modo, las ratas prenatalmente expuestas al AVP presentan alteraciones conductuales similares a las observadas en pacientes con TEA³². Por lo tanto, se ha utilizado la exposición prenatal al AVP como un modelo animal para el estudio de este trastorno³³.

Se sabe que en modelos animales del TEA, existe una disminución de los niveles

de ACh, tanto al nivel de la corteza prefrontal³⁴, como del estriado^{35,36}, acompañado de un incremento de la rigidez cognitiva y una deficiente interacción social. Estos antecedentes sugieren fuertemente que, de manera general, en el TEA existe un desbalance en los niveles de ACh y permiten la posibilidad de que esto se pueda encontrar también en el SNE, contribuyendo a los trastornos gastrointestinales observados en las personas con autismo. Las ratas prenatalmente expuestas al AVP presentan déficits conductuales similares a los observados en pacientes con TEA.

En resumen, se han descrito alteraciones en la organización neuronal y la conectividad en el sistema colinérgico en el SNC en el TEA^{34,35}. Además, no se conoce la fisiopatología de los síntomas gastrointestinales que presentan algunos pacientes con este trastorno, sin embargo, se sabe que la acetilcolina es el principal neurotransmisor en el SNE, encargado de la motilidad y la función secretora en el intestino. Conociendo esto, la pregunta que se intentó responder en este trabajo fue: ¿Existen alteraciones colinérgicas en el SNE que nos permitan explicar la sintomatología gastrointestinal de los pacientes con TEA? Tomando como hipótesis que el sistema colinérgico se encuentra alterado en el modelo murino del TEA, provocando trastornos en la motilidad intestinal.

El objetivo general de este trabajo fue entonces identificar las alteraciones motoras, funcionales y moleculares asociadas al sistema colinérgico en el sistema digestivo del modelo murino de TEA basado en la exposición prenatal al AVP.

2. Materiales y Métodos

Animales de experimentación. Para el presente proyecto de investigación, se emplearon ratas Sprague-Dawley, machos y hembras, las cuales fueron obtenidas del Bioterio General de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. De 2 a 3 animales fueron mantenidos en cajas de acrílico bajo condiciones de ciclo luz/oscuridad 12:12, con temperatura y humedad controladas (25° C) y con alimento y agua ad libitum; Todo esto, de acuerdo con el comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (BGFMUASLP-08-20).

Obtención del modelo del TEA en rata. El AVP es utilizado en la práctica clínica como anticonvulsivante y estabilizador del ánimo, sin embargo, se ha demostrado que la exposición prenatal al AVP está asociada con la aparición del TEA, tanto en humanos como en animales³⁷. En diversos estudios, tanto ratas como ratones expuestos

al AVP prenatalmente, muestran síntomas semejantes a los asociados con los pacientes con el TEA; por ejemplo: disminución en la interacción social, incremento de las conductas repetitivas e incremento de la ansiedad. Debido a esto es que empleamos este modelo para el presente proyecto.

Se formaron 10 parejas separadas en dos grupos (control y experimental) con animales de distinto grupo genético y se aparearon durante la noche, se verificó el apareamiento mediante la técnica del tapón espermático antes de las 9:00 horas, registrando ese momento como el día de la concepción o día 0 de la gestación. Al día 12.5, de acuerdo con la metodología establecida³⁶, se administró al grupo experimental una dosis única de ácido valproico (500 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO) diluido en solución salina al 0.9 % por vía intraperitoneal, mientras que a las ratas del grupo control les fue administrado el mismo volumen de solución salina al 0.9 % vía intraperitoneal. El parto se produjo de manera normal a los 21±1 días, aquellos animales que no presentaron éste comportamiento o en los que se presentó canibalismo filial fueron descartados.

La descendencia de ambos grupos se mantuvo con su madre hasta el día 23 postnatal, fecha en la que se retiró a las crías y se separó a los machos; para el presente estudio se utilizó un total de 34 machos (18 control y 16 machos expuestos prenatalmente al AVP) (aprobación del comité de ética BGFMUASLP-08-20).

2.1. Pruebas conductuales

Actividad motriz. Se utilizó la prueba de campo abierto (Open field test) para caracterizar y comparar la conducta de los animales estudiados ante entornos amplios y desconocidos. Consistió en el uso de una caja cuadrada de polipropileno de 70 x 70 cm cuya base se marcó para dividirla en nueve sectores iguales. El piso y las paredes de la caja fueron rociadas con solución limpiadora (5ml de amoníaco, 5ml de Pinol, 5ml de alcohol absoluto y 985ml de agua) previo a iniciar las pruebas y entre animal y animal, para evitar olores residuales de animales previos. Al iniciar la prueba, se colocó al animal en el sector central de la caja y se le permitió explorar libremente el espacio. La actividad motora del animal fue grabada en video durante un periodo de 20 minutos bajo iluminación uniforme y al terminar las pruebas, se contabilizó en centímetros la distancia total recorrida por cada animal utilizando el software Path Recorder V0.01-alpha³⁸. Como una medida de la ansiedad sentida por el animal ante el estímulo que la caja representa, se contó manualmente el número de veces en las que el animal cruzó hacia el sector central de la caja y el

número total de partículas fecales producidas durante la prueba.

Interacción social. Para evaluar la sociabilidad de los animales se empleó la prueba de interacción social de tres cámaras (Three chamber sociability test), que consiste en una caja de acrílico transparente de 90 x 30 x 30 cm, dividida en tres cámaras iguales comunicadas entre sí y denominadas A, B y C; siendo B la cámara central. La prueba se realizó en dos sesiones: la primera (habitación) con duración de cinco minutos, durante la que el animal estudiado se colocó en la cámara central y se le permitió explorar la caja con libertad. La segunda sesión (interacción) tuvo una duración de diez minutos, se colocó nuevamente al animal estudiado en la cámara central pero en esta ocasión se introdujo un sujeto extraño que no había tenido contacto previo con el animal estudiado (como sujetos extraños se utilizaron dos ratas adultas macho de la cepa Wistar, de edades similares a las de los animales estudiados), dicho sujeto extraño se colocó dentro de una jaula de plástico en una de las cámaras de los extremos (A o B) de manera aleatoria. En la cámara del extremo contrario, se colocó una jaula de plástico idéntica, pero vacía. Al animal estudiado nuevamente se le permitió explorar el terreno e interactuar con el extraño.

La caja fue rociada con solución limpiadora entre animal y animal, pero no entre sesiones del mismo animal.

La actividad durante la prueba fue grabada en video para su posterior análisis mediante el software Activity Test Counter V0.05³⁹. Se contabilizó el porcentaje de tiempo que el animal problema pasó en cada una de las tres cámaras durante ambas sesiones, los segundos que tardó el animal problema en interactuar por primera vez con el extraño (latencia), el número total de veces que los animales interactuaron y el tiempo total de interacción en segundos. El cociente de estos dos últimos valores se denominó **índice de interacción** y se utilizó como una medida de la sociabilidad de cada animal.

Obtención de tejido. Todos los animales que se sometieron a la extracción de tejido fueron sometidos a un ayuno previo por 12 horas, con acceso a agua ad libitum para permitir el vaciado intestinal. El protocolo de anestesia para la cirugía consistió en una dosis de Ketamina (150 mg/kg) y una de Xilacina (30mg/kg) ambas por vía intraperitoneal. Al pasar 15 minutos de la aplicación de los fármacos se comprobó el efecto anestésico y se procedió a la disección mediante una incisión en la línea media en el abdomen, una vez dentro de la cavidad abdominal se identificó el ciego, el colon y el íleon y se separaron de su adhesión mesentérica

las estructuras mencionadas. Se pinzaron y extrajeron los 15 centímetros más distales de íleon, trasladándolos inmediatamente a una caja de Petri con solución de Tyrode (NaCl:137mM, KCl:2.7mM, MgCl₂:1mM, CaCl₂:1.8mM, NaH₂PO₄:0.2mM, NaHCO₃:12mM, D-Glucosa:5.5mM) a 37° C previamente burbujeada con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂). Se procedió a la limpieza externa del intestino retirando el tejido vascular y conectivo asociado, así como de los contenidos intestinales usando solución de Tyrode únicamente con la presión hidrostática generada por una pipeta Pasteur para evitar lesionar el tejido. Una vez limpio se cortó en nueve secciones: cuatro de éstas fueron anillos de 0.5-0.7 cm de longitud que se transfirieron a vasos de precipitados con solución de Tyrode, de donde fueron trasladados inmediatamente a los baños de órgano aislado para experimentos de tensión. Se cortaron otros cuatro anillos de 1 cm, que fueron abiertos de manera longitudinal y lavados sin fricción mecánica con solución de Tyrode y colocados en tubos de 1.5 mL, mismos que fueron congelados inmediatamente mediante su inmersión en nitrógeno líquido. Estos segmentos fueron almacenados posteriormente a -70° C y se mantuvieron así para su uso posterior.

Al finalizar la extracción de tejido, el animal fue sacrificado mediante un corte en la aorta abdominal y el cadáver se manejó de acuerdo con los protocolos dispuestos por el Bioterio de la Universidad.

2.2. Tensión isométrica

Para cuantificar la actividad motora de los segmentos intestinales disecados y comparar su respuesta a distintos fármacos, se realizaron experimentos de tensión isométrica, que consistieron en la colocación de anillos de íleon en baños de órgano aislado, con 6ml de solución de Tyrode y burbujeados constantemente con carbógeno y mantenidos a 37° C. Los anillos fueron suspendidos por medio de ganchos a un transductor de tensión (Grass instruments) y éstos a un polígrafo (Grass Model 67D) que registró la actividad motora del músculo intestinal en papel y digitalmente por medio de una interfaz análogo-digital conectada a una computadora de escritorio.

Previo limpieza y calibración del equipo se montó el tejido y se le sometió a una tensión de 4 gramos a manera de precarga, durante 40 minutos. Al finalizar este periodo se valoró la actividad basal del tejido y aquellos anillos que no presentaban movimiento espontáneo fueron descartados del experimento.

El protocolo farmacológico consistió en una curva dosis-respuesta usando carbacol,

atropina y d-tubocurarina (Sigma, St. Louis, MO) como agonista y antagonistas colinérgicos, respectivamente. En cada experimento se asignaron al azar uno o dos anillos para ser tratados con antagonista, para esto se realizó la aplicación de atropina (7.5 nM) o D-tubocurarina (50nM) a la solución del baño 5 minutos previos a iniciar la curva dosis-respuesta. El protocolo consistió en la aplicación de dosis crecientes de carbacol (100nM, 500nM, 1µM, 2.5µM, 5µM, 10µM) cuidando de no aplicar el fármaco directamente al tejido y dejando pasar diez minutos entre dosis, siempre manteniendo las condiciones de pH y temperatura del baño. Al finalizar, se realizó un lavado con solución de Tyrode (37°C y burbujeada con carbógeno) y se permitieron 10 minutos para observar el comportamiento de los anillos. El experimento tuvo una duración total de 100 minutos, al finalizar, se desmontaron los anillos y se colocaron en una caja de Petri para ser llevados a un horno de secado donde se mantuvieron a 50°C por 24 horas para posteriormente pesarlos.

Al terminar los experimentos se graficó la media de las respuestas máximas obtenidas a cada dosis para elaborar la curva dosis-respuesta y se determinó la EC₅₀ para el carbacol en ambos grupos por cada tratamiento y se compararon entre sí. Se determinó también si existía diferencia entre los grupos a cada dosis usando una t no pareada.

Los registros digitales se analizaron inicialmente con el software PolyView v2.5 (Grass Instruments, Astro-Med Inc.) y posteriormente con Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Se evaluó la tensión máxima alcanzada por cada anillo por dosis, así como la frecuencia de contracción observada en la estabilización y en cada dosis de fármaco.

Homogenización de tejido y cuantificación de proteínas. Las muestras de tejido conservadas a -70°C fueron procesadas para la posterior extracción de proteína, para esto se suspendió la muestra en 1 ml de buffer de lisis RIPA (Tris HCl 1.5M pH 8.8: 50mM, NaCl: 150mM, NP-40: 1 %, Desoxicolato de sodio: 0.5 %, SDS: 0.1 %, almacenado a 4°C) 1X con inhibidores de proteasas (cat. no. P8340, Sigma) y se homogenizaron utilizando un dispositivo Tissue-Tearor (BioSpec Products, Bartlesville, OK) para posteriormente ser centrifugados a 10,000 RCF durante 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante para la cuantificación de proteínas, para la que se utilizó el método de BCA, utilizando el kit SC-202389 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) para lo que se utilizó una curva de calibración con estándares de BSA diluidos en buffer de RIPA 1:10 y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA) junto con las muestras por triplicado

a una longitud de onda de 562 nm. Al finalizar se promediaron las absorbancias de las muestras y se compararon con las de la curva de calibración para obtener la concentración de proteína en cada muestra.

2.3. Western-Blot

Se tomaron 40µg del extracto proteico previamente descrito, se le añadió el mismo volumen de buffer de Laemmli con 10 % β -mercaptoetanol y se llevó la mezcla a 95°C por 10 minutos. Posteriormente, se separaron las proteínas con geles de poliacrilamida-SDS al 12 %, con el equipo Bio-Rad Mini Protean (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 110V durante 120 minutos y posteriormente se realizó la transferencia húmeda a una membrana de PVDF de 0.22µm durante 60 minutos a 100V/0.35A. Una vez terminada la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 h a 4°C con solución bloqueadora, elaborada con buffer TBS-T (Tris 25 mM, NaCl 135mM, KCl 2.7 mM, Tween 20 al 0.1 %; pH 7.4) mas leche libre de ácidos grasos (Svelty, Nestlé S.A.) al 5 %. Al terminar se lavó la membrana y se procedió a incubar con el anticuerpo primario (anti-M3, Sigma) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con el buffer TBS-T en 3 ocasiones durante 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario contra conejo conjugado con peroxidasa de rábano (1:5000) (Abcam, Cambridge, MA), por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a esto, se realizaron otros 3 lavados con TBS-T. Finalmente, se revelaron las bandas utilizando un kit de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL, Bio-Rad) exponiendo las membranas a placas fotográficas especializadas (Thermo Fisher Sci. Inc., Rockford, Il) y revelando con soluciones comerciales (Eastman Kodak Inc., Rochester, NY). Las bandas fueron normalizadas a la expresión de β -actina (Anticuerpo policlonal de conejo, Abcam 1/1000) utilizando el software ImageJ 1.8.0_112 (NIH, USA). Finalmente se fotografiaron las placas con un transiluminador y las imágenes resultantes se procesaron en Adobe Illustrator CC 2019 (Adobe Inc.)

Análisis de datos. Se realizó el análisis de los datos utilizando el software Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Los experimentos de conducta fueron videograbados y todo el análisis se realizó sobre los archivos de video, usando la misma suite estadística. Para los experimentos de tensión se procesaron los datos crudos con el software PolyView v2.5 y posteriormente con Prism 5. El diseño experimental de los experimentos de tensión correspondió a bloques al azar, dado que se aplicaron protocolos distintos a anillos del mismo animal. n se refiere al número de anillos

utilizados. Para todos los datos se realizaron pruebas de normalidad usando la prueba de Shapiro-Wilk y posteriormente t no pareada o ANOVA de una o dos vías según fuese el caso. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Todas las gráficas fueron procesadas posteriormente con Adobe Illustrator CC 2019.

3. Resultados

3.1. Pruebas conductuales

Actividad Motriz. La prueba de campo abierto se le realizó a una n de 28 animales (14 controles y 14 expuestos al AVP), a una edad promedio de 58.3 ± 3.4 días de vida. La actividad motriz de los animales expuestos al AVP no difirió significativamente de aquella mostrada por los animales control, al comparar ambas distancias con una t no pareada ($p=0.81$, CI 95 %: -764.0-957.7) (**Figura 1,B**) Además, se analizó la preferencia del animal a transitar a través del sector central de la caja contando las veces que cruzó hacia este durante la prueba. En esta medición se encontró una diferencia entre ambos grupos al analizar los datos con una t no pareada ($p=0.041$, CI 95 %: 0.26-12.60) (**Figura 1,C**).

Las partículas fecales producidas por los animales fueron contabilizadas manualmente al terminar cada experimento y posteriormente comparadas entre si con una t no pareada, encontrando que los animales expuestos al AVP mostraron un aumento significativo en la producción de materia fecal ($p=0.0032$, CI 95 % -5.71 - -1.28) (**Figura(2)**).

Interacción social. Durante la fase de habituación en la prueba de interacción social de tres compartimentos se analizó la preferencia del animal por alguna cámara, mediante el porcentaje de tiempo que exploró cada cámara. Se encontró que no hubo una diferencia entre los animales de ambos grupos en este criterio mediante una ANOVA de dos vías ($p>0.05$); sin embargo, durante la fase de interacción se analizó el índice de interacción:

$$\frac{\text{Número de interacciones}}{\text{Duración de cada interacción}}$$

y se encontró una diferencia significativa usando una t no pareada: Los animales expuestos al AVP mostraron una sociabilidad significativamente disminuída ($p=0.03$, CI 95: % 0.0049-0.067) con respecto a los animales control (n=14 control, 14 AVP) (**Figura 3**).

3.2. Tensión isométrica

Cada experimento de tensión isométrica tuvo una duración total de 100 minutos, durante los primeros 40 se realizó la estabilización del tejido en el aparato de

tensión isométrica. El protocolo farmacológico consistió en cuatro grupos experimentales de anillos: Únicamente agonista (carbacol), agonista + antagonista muscarínico (atropina), agonista + antagonista nicotínico (d-tubocurarina) y agonista + ambos antagonistas. Se usaron las siguientes dosis de agonista: 100nM, 500nM, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M y 10 μ M (**Figura 4**).

Durante el periodo de estabilización se analizaron las contracciones máximas alcanzadas por los anillos con una t no pareada, sin encontrar diferencias entre grupos ($p=0.18$). Además, se determinó la frecuencia media de contracciones tomando un segmento de actividad estable de 10 minutos de duración y contando el número total de contracciones entre el tiempo total en segundos (600 segundos). Se analizó el conjunto de datos con una t no pareada sin encontrar diferencias en la motilidad basal ($p=0.83$) ($n=36$ control, 41 AVP) (**Figura 5**).

Al analizar las respuestas máximas producidas por los anillos a los que se les administró agonista, se encontró una respuesta contráctil aumentada en aquellos provenientes de ratas del grupo expuesto al AVP, siendo significativa la diferencia a la dosis de 2.5 μ M ($p=0.03$, 95 %CI: -4.429– -0.1735. $EC_{50}:0.8\mu$ M)(**Figura 6a**). En algunos experimentos se añadió también una dosis de atropina (7.5nM) previa a la aplicación de carbacol. Los anillos tratados con atropina provenientes de ratas del grupo AVP mostraron una tendencia no significativa a presentar contracciones máximas menores, con una varianza más pequeña en tres de las cinco dosis (1 μ M: $p=0.02$; 2.5 μ M: $p=0.007$; 5 μ M: $p=0.02$. $EC_{50}:0.78\mu$ M. F test)(**Figura 6b**).

Del mismo modo, se administró a otro grupo de anillos un pre-tratamiento con el agonista nicotínico d-tubocurarina a dosis de 50nM. Se encontró una pérdida de la respuesta en ambos grupos de anillos, con una tendencia no significativa de los anillos AVP a presentar respuestas menores. Se analizaron las varianzas con F-test sin encontrar diferencias entre ellas ($EC_{50}:500nM$) (**Figura 7a**).

Un último grupo de anillos fue tratado con ambos antagonistas colinérgicos, atropina a 7.5nM y d-tubocurarina a 50nM, encontrándose nuevamente una inhibición casi total de la respuesta, con una tendencia de los anillos AVP a tener respuestas menores a los anillos control. Esta diferencia no fue significativa, así mismo la diferencia entre las varianzas de los grupos $EC_{50}:150nM$) (**Figura 7b**).

3.3. Western-Blot

Para observar las diferencias en la expresión proteica entre las muestras, se sometió al homogenado de tejido adicionado con buffer de RIPA e inhibidores de proteasas a un tratamiento por 10 minutos a 95 °C en presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol). Posteriormente se corrieron las proteínas resultantes en un gel de poliacrilamida al 12 % y la membrana a la que se transfirieron fue incubada con anticuerpos anti-M3 y anti-actina, de manera tal que se obtuvo el patrón de bandeos que se observa en la **figura 8**. Se observa la presencia de múltiples bandas en los pesos moleculares de 70kDa a 90kDa. Este mismo patrón no se observa en la muestra proveniente de una rata control, y se relaciona con la presencia de dímeros o trímeros del receptor M3. La expresión de β -actina fue similar en las cuatro muestras estudiadas.

4. Discusión

El objetivo de este trabajo fue explorar las diferencias en la conducta contráctil del íleon de ratas de un modelo del TEA con respecto a los animales control, así como la expresión de los receptores muscarínicos en ambos grupos. El modelo murino del TEA basado en el AVP ha demostrado ser una herramienta útil para estudiar las bases fisiológicas de este trastorno^{40,41}, sin existir hasta el momento estudios que evalúen las alteraciones existentes en la función intestinal de estos animales.

Conducta. Los sujetos que fueron expuestos al AVP presentaron conductas consistentes con un aumento en la ansiedad y emocionalidad en general, a la vez que mostraron una capacidad menor de interactuar con un sujeto extraño, lo que demostró una disminución en la interacción social. Todos estos comportamientos son congruentes con lo reportado en trabajos previos^{32,37,41,42,36} empleando este modelo animal, así como con las conductas conocidas como características clave del TEA. No existió una diferencia en el crecimiento y desarrollo general de los animales.

Motilidad intestinal. Los experimentos realizados en los anillos intestinales de los animales expuestos al AVP mostraron una actividad peristáltica basal similar que los controles, en ausencia de estimulación farmacológica. Sin embargo, la actividad mecánica mostró una distinta sensibilidad a la estimulación por un agonista colinérgico (carbacol) inespecífico (**Figura 6**), así como a la inhibición por antagonistas colinérgicos (atropina y tubocurarina; ver **Figura 7b**). En presencia de carbacol (agonista de los receptores muscarínicos y nicotínicos), los plexos del SNE se activan, provocando el aumento de la actividad contráctil del músculo liso intestinal. Este incremento en la contractilidad en los anillos intestinales de las ratas AVP fue significativamente mayor que el del grupo control, sugiriendo una mayor sensibilidad de los plexos entéricos o bien de la maquinaria contráctil muscular en este tejido.

Estos resultados contrastan con dos trabajos donde se estudió la contractilidad gastrointestinal asociada a modelos del TEA. Por un lado, James y colaboradores⁴³, observaron un enlentecimiento del vaciado gastrointestinal en un modelo de pez cebra, que imita al síndrome Phelan-Mc Dermid por delección del gen SHANK3. Este síndrome se considera un tipo monogénico del TEA, que se presenta en humanos y que permite un estudio más homogéneo de la patología. En este modelo, las con-

tracciones peristálticas son significativamente débiles y menos frecuentes que en los peces control, lo cual explica que el vaciamiento se vuelva más lento. Cabe mencionar, que en este trabajo no se estudió el papel de la señalización colinérgica sino la dependiente de serotonina, en donde se encontró una disminución en la expresión de células enteroendócrinas positivas para este neurotransmisor. Por otro lado, el modelo autosómico probablemente posea diferencias funcionales con el modelo murino que se utilizó en nuestro trabajo.

Otro trabajo realizado por Kim y colaboradores³⁴, en un modelo murino por exposición al AVP, mostró también una disminución en la motilidad intestinal, evaluada por la técnica de tránsito de azul de Evans. Al estimular el tejido con metoclopramida, el íleon de ratas AVP mostró menor sensibilidad y actividad contráctil que el tejido control. Cabe mencionar, que en este trabajo el énfasis no se encontraba en estudiar al sistema colinérgico. La metoclopramida es un fármaco con efecto procinético ampliamente utilizado en la clínica para tratar la gastroparesia, actúa antagonizando receptores dopaminérgicos D2 y activando receptores serotoninérgicos 5-HT₄. Dichos efectos también pueden causar indirectamente la liberación de acetilcolina, sin embargo, el efecto que se observa no depende únicamente secundariamente de esta vía. Otro hallazgo de este trabajo, fue el adelgazamiento de la mucosa y la capa muscular del íleon en ratas AVP, que podrían explicar también la reducida motilidad intestinal. En nuestro trabajo no exploramos cambios histológicos, lo cual nos permitiría comprender con mayor profundidad las alteraciones contráctiles que observamos.

Con la finalidad de comprender la participación del sistema colinérgico en las diferencias observadas, se utilizó el antagonista muscarínico atropina. La presencia de esta sustancia, resultó en una inhibición significativamente mayor de la actividad contráctil en anillos de ratas AVP, con respecto a las ratas control. Lo anterior concuerda con una mayor actividad colinérgica en ratas AVP. Para ahondar aún más en el origen de las diferencias observadas, se administró una dosis de d-tubocurarina, antagonista de los receptores nicotínicos. Se observó que la actividad intestinal se abatió totalmente en ambos grupos.

Al existir una diferencia entre grupos en la sensibilidad a la inhibición con atropina y d-tubocurarina, se puede concluir que posiblemente exista una diferencia en la función o en la expresión de los receptores muscarínicos de los intestinos de

ambos grupos. Esta diferencia no se vuelve evidente hasta que se estimula la actividad parasimpática del animal, ya sea de manera artificial por medio de la administración directa de fármacos o de manera natural, consecuencia del aumento de la actividad del SNE en respuesta a la alimentación y el estado emocional del animal. Los trastornos de la motilidad intestinal están relacionados en humanos a diversos síntomas (en otras palabras, son secundarios a la activación parasimpática), por lo tanto, encontrar una respuesta al origen de estos síntomas implica estudiar la función motriz del intestino y, por consecuencia, la respuesta muscarínica del SNE.

Se sabe que en los miocitos de íleon de rata, la estimulación colinérgica genera una corriente catiónica que depende de la actividad sinérgica de receptores M2 y M3. Esta actividad involucra proteínas G de tipo G_i/G_0 . Esta estimulación, depende de la hidrólisis del PIP2 mediada por la fosfolipasa C, sin involucrar señalización río abajo de dicha hidrólisis. Se cree que para que la señalización funcione, requiere de una vía compleja y especial, que debe ser investigada a mayor profundidad y en especial en condiciones patológicas como el TEA⁴⁴.

Expresión del receptor M3. Con la finalidad de investigar el origen de las alteraciones mecánicas observadas, se evaluó la expresión del receptor muscarínico M3, principal implicado en la contracción del músculo liso intestinal. Existen dos tipos de receptores involucrados en la transmisión colinérgica del SNE: receptores muscarínicos y nicotínicos. Los nicotínicos se emplean en la señalización neural rápida que se necesita para la propagación de reflejos entéricos, son receptores ionotrópicos. Los muscarínicos son receptores metabotrópicos acoplados a segundos mensajeros; dependiendo del tipo de receptor, el mensaje molecular y las respuestas generadas son diferentes. Los receptores M1 y M3 se encuentran acoplados a la proteína $G_q/11$ asociada a la liberación de calcio intracelular; los receptores M2 mientras tanto, se acoplan a la proteína G_i/G_0 cuya activación inhibe la síntesis de AMP cíclico.

Por otro lado, se sabe que los receptores muscarínicos pueden formar dímeros y oligómeros alterando su funcionalidad y expresión⁴⁵. Los receptores muscarínicos han sido estudiados en varios segmentos del tubo digestivo, y se ha encontrado que los receptores M1, M2 y M3 se expresan ampliamente en el músculo liso circular y longitudinal^{46,47}, así como en las neuronas del sistema nervioso entérico, mediando la liberación de acetilcolina²⁴. Se ha descrito en el colon que los recepto-

res muscarínicos M1, M2 y M3 se expresan con una proporción establecida de 80 % de M2r y 20 % de M3r, aproximadamente, con una expresión marginal del M1r. A pesar de que los receptores M3 se expresan en menor proporción, funcionalmente, dominan el proceso contráctil en este sistema^{24,28}.

Los receptores M3, al estar acoplados a la vía de movilización de calcio, inician el mecanismo clásico de contracción muscular; por otro lado, los receptores M2 al inhibir la actividad de adenilato ciclasa, silencian los mecanismos relajantes evocados por otros receptores como los adrenérgicos. En estudios realizados en ratones knock-out para los receptores M2 y M3, la respuesta a carbacol disminuyó considerablemente al suprimir la expresión de M2 y se eliminó por completo al suprimir la expresión de sólo M3 o M2 y M3 al mismo tiempo. La activación selectiva de M1 aumentó la respuesta contráctil de tiras colónicas en este modelo, siempre y cuando se expresaran en conjunto todos los receptores muscarínicos⁴⁶.

Al analizar las proteínas extraídas de las muestras de intestino de ratas control, se encontró un patrón de bandeo correspondiente a varios pesos moleculares que se ha relacionado en trabajos previos con la presencia de dímeros u oligómeros del receptor⁴⁸. Se ha demostrado que la dimerización de los GPCRs de clase A es capaz de modular la eficiencia de la activación de las proteínas G, así como la fosforilación del propio receptor⁴⁹.

De manera interesante, el patrón de bandeo de las muestras de animales AVP fue distinto al de los animales control. Este patrón distinto en el bandeo, que sugiere un patrón de oligomerización distinto, podría explicar la modulación alterada del sistema colinérgico en el SNE. Se sabe que, in vivo, la oligomerización no es necesariamente debido a interacciones proteína-proteína, si no que puede ser dada por interacciones lipídicas⁴⁷ y puede o no tener diferentes implicaciones funcionales⁴⁹, ya sea con una modulación diferencial de la transducción de señales río abajo o con una mayor densidad de receptores en un solo sitio, lo que podría modificar la respuesta a la estimulación farmacológica. Por esta razón, es posible que la respuesta alterada en la contractilidad pueda estar originada en una oligomerización distinta de los receptores muscarínicos, que se traduzca a su vez en una cascada de segundos mensajeros alterada. Esto tiene el potencial de cambiar de manera perceptible la motilidad intestinal y originar así la sintomatología ya descrita.

5. Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo muestran que el intestino de los animales de este modelo de TEA presentan una respuesta alterada en la función dependiente de los receptores muscarínicos, en especial del M3. Además, los resultados muestran posibles alteraciones en la dimerización/oligomerización de los receptores muscarínicos tipo 3. Para determinar si estos dos hallazgos tienen alguna relación causal y si en ellos radica parte del origen de las comorbilidades gastrointestinales de los pacientes con TEA, es necesario continuar estudiando la formación de los dímeros/oligómeros del receptor, su localización y cantidad, así como el sistema nervioso entérico en su conjunto y el sistema colinérgico en general.

Índice de figuras

1.	Los animales expuestos al AVP exhiben comportamientos motrices relacionados con ansiedad.	24
2.	Los animales del grupo AVP mostraron conductas relacionadas con un aumento en la emocionalidad. . .	25
3.	Los animales expuestos al AVP presentan una disminución en su interacción social con un sujeto extraño. . .	25
4.	Protocolo farmacológico de dosis-respuesta a carbacol.	26
5.	Motilidad intestinal basal.	26
6.	Curvas dosis-respuesta en presencia de agonista y antagonista colinérgicos.	27
7.	Curvas dosis-respuesta en presencia de agonista y antagonistas colinérgicos.	28
8.	Detección de M3R en muestras de intestino.	29

6. Figuras

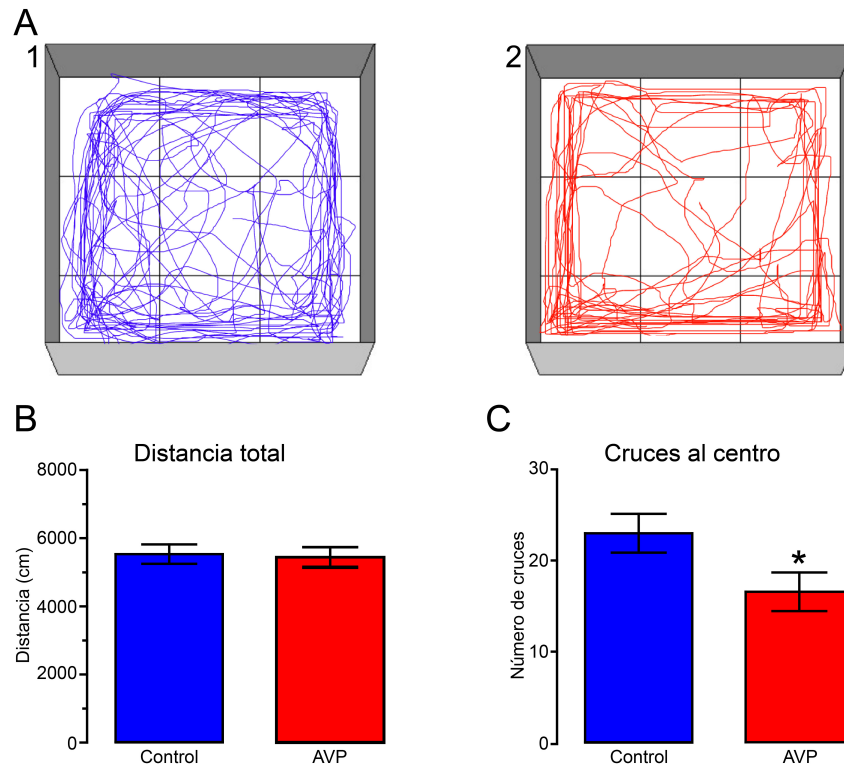


Figura 1: Los animales expuestos al AVP exhiben comportamientos motrices relacionados con ansiedad. A. Se muestran dos trazos representativos del recorrido que tomaron dentro de la caja un animal control (1) y uno expuesto al AVP (2). B. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en la distancia total durante la prueba de campo abierto. C. Se observó un menor número de cruces al sector central de la caja en los animales expuestos ($p=0.041$, CI 95 %: 0.26-12.60) con una *t* no pareada. Datos expresados como media \pm error estándar ($n=14$ control, 14 AVP).

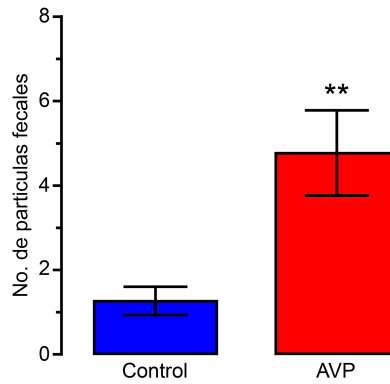


Figura 2: Los animales del grupo AVP mostraron conductas relacionadas con un aumento en la emocionalidad. Se contabilizaron las partículas fecales producidas por cada animal durante los 15 minutos de la prueba, encontrando una producción aumentada de éstas en los animales expuestos (t no pareada, $p=0.003$, CI 95: % -5.71– -1.28). Datos expresados como media \pm error estándar (n=14 control, 14 AVP).

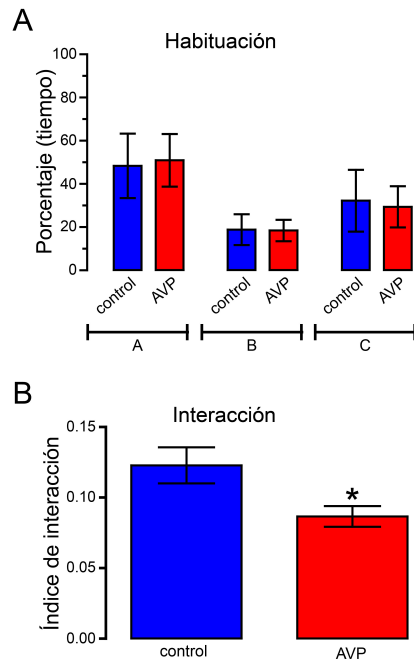


Figura 3: Los animales expuestos al AVP presentan una disminución en su interacción social con un sujeto extraño. Prueba de interacción social de tres compartimentos. A. No se encontró diferencia durante la habituación en el tiempo que pasan los animales en cada compartimento de la caja (ANOVA de dos vías, $p>0.05$) (El eje de las x representa cada uno de los compartimentos: A, B y C). B. Sin embargo, existió una diferencia significativa en el índice de interacción (t no pareada, $p=0.03$, CI 95: % 0.004-0.067). Datos expresados como media \pm error estándar (n=14 control, 14 AVP).

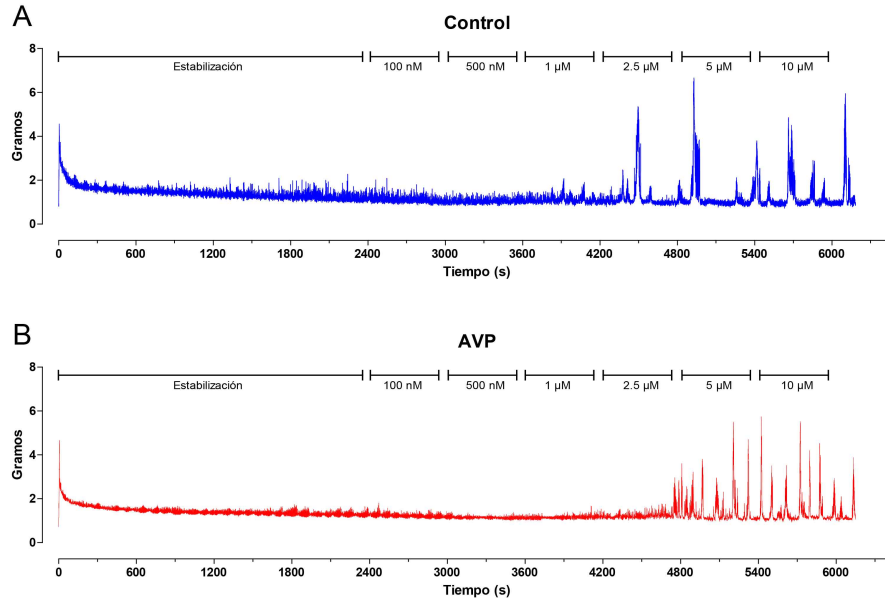


Figura 4: Protocolo farmacológico de dosis-respuesta a carbacol. Se muestran dos registros representativos de tensión isométrica (expresada en gramos) en respuesta a dosis crecientes de carbacol. A. Anillo de íleon obtenido de un animal control. B. Anillo de íleon obtenido de un animal expuesto al AVP. Duración total del experimento: 100 minutos.

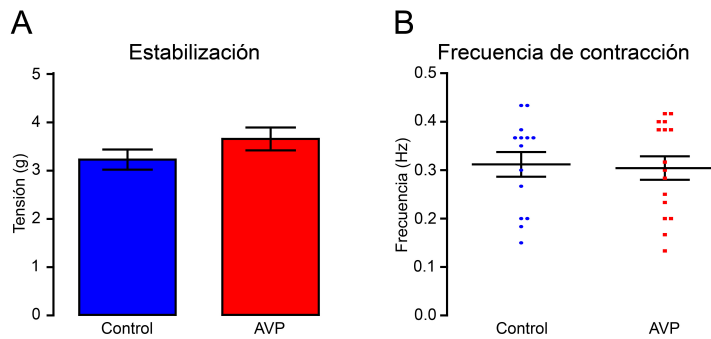
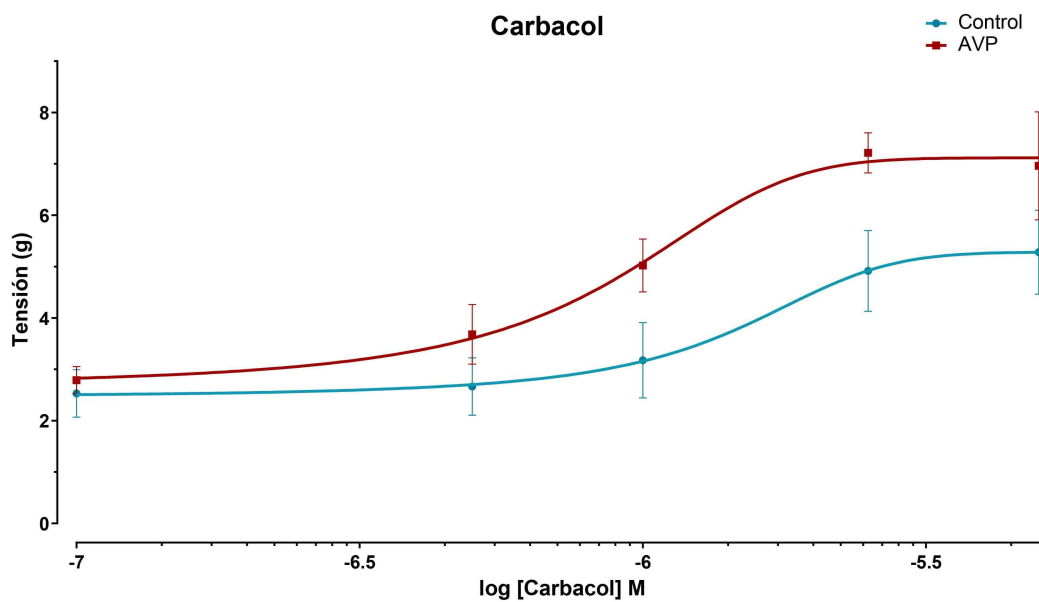
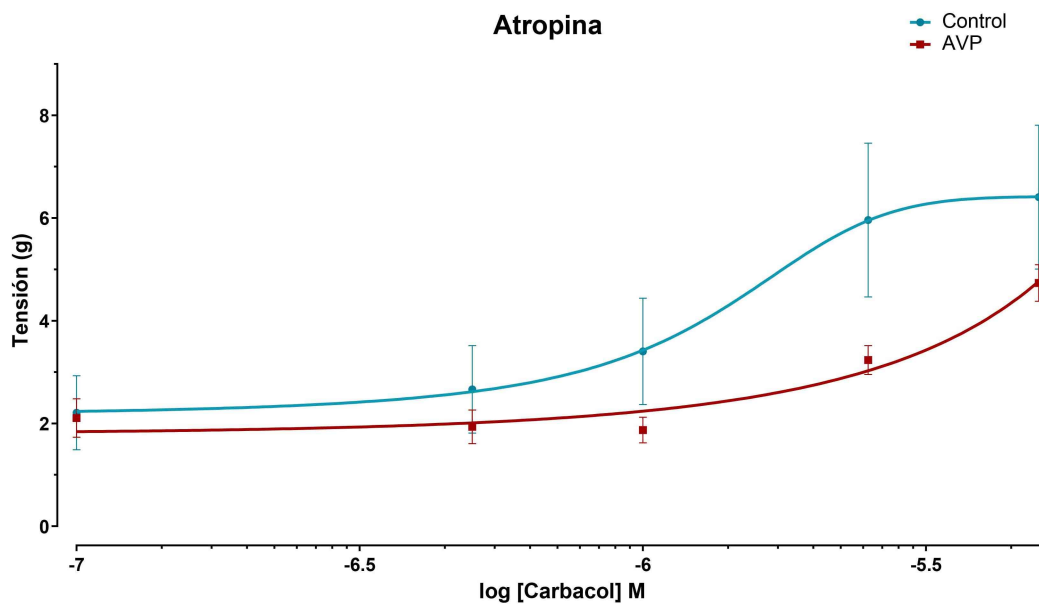


Figura 5: Motilidad intestinal basal. Previo a la aplicación de fármacos, se midió la tensión máxima alcanzada (A) y la frecuencia de las contracciones (B) para todos los anillos. No se encontraron diferencias en la actividad entre los anillos provenientes de animales control y de animales expuestos al AVP. (Estabilización: $p=0.18$; Frecuencia: $p=0.83$). Datos expresados como media \pm error estándar ($n=36$ control, 41 AVP).

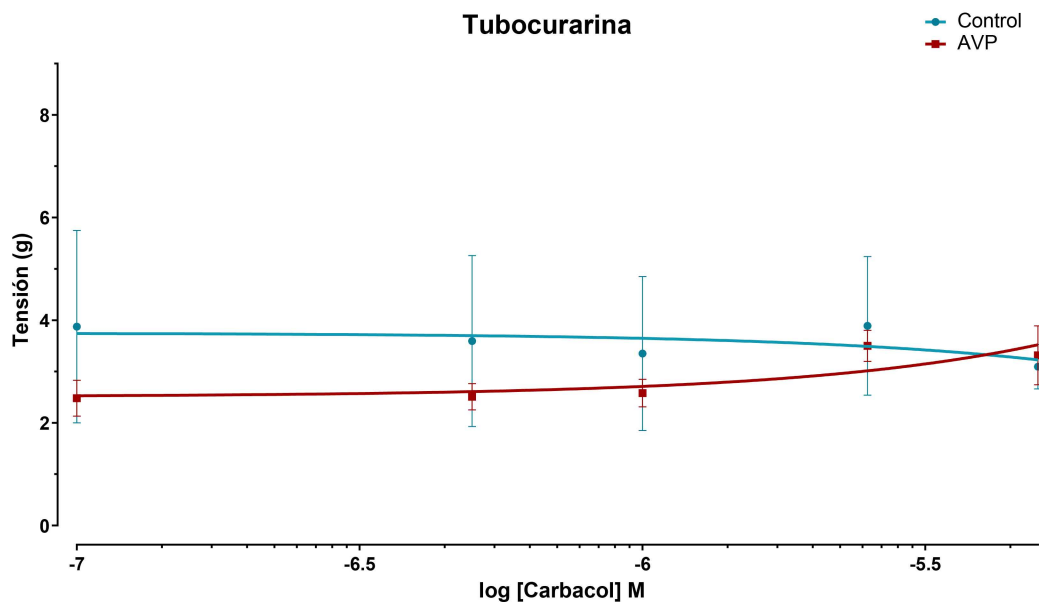


(a)

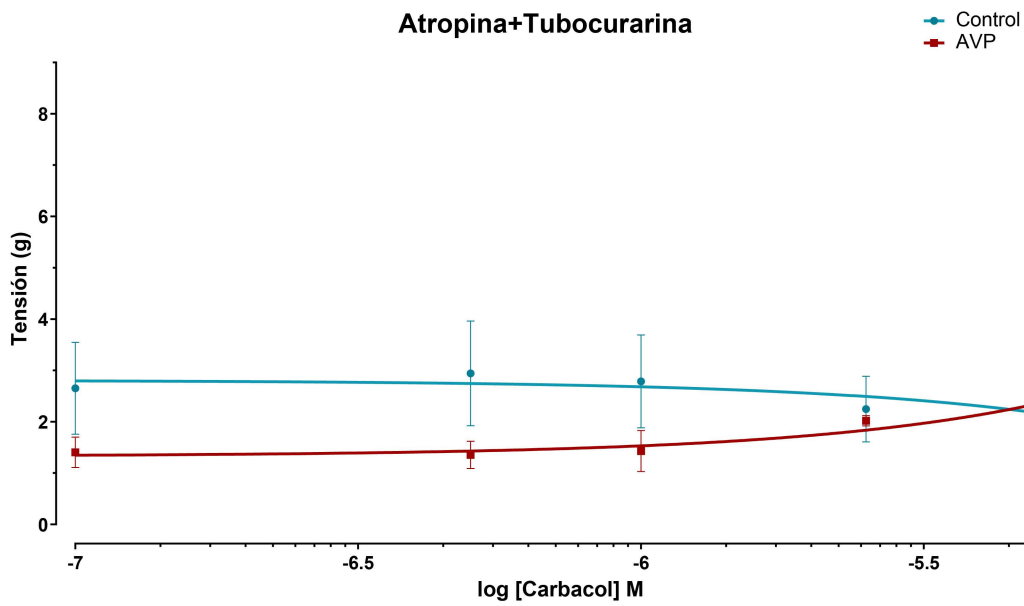


(b)

Figura 6: Curvas dosis-respuesta en presencia de agonista y antagonista colinérgicos. A. Respuesta a dosis crecientes de carbacol (n=6, 5). B. Respuesta a dosis crecientes de carbacol en presencia de un antagonista muscarínico (atropina) (n=4, 5). Se grafican las medias \pm error estándar de las contracciones máximas a cada dosis de carbacol.



(a)



(b)

Figura 7: Curvas dosis-respuesta en presencia de agonista y antagonistas colinérgicos. A. Respuesta a dosis crecientes de carbacol en presencia de un antagonista nicotínico (d-tubocurarina) (n=2, 4). B. Respuesta a dosis crecientes de carbacol en presencia de un antagonista nicotínico (d-tubocurarina) y un antagonista muscarínico (atropina) (n=3, 2). Se grafican las medias \pm error estándar de las contracciones máximas a cada dosis de carbacol.

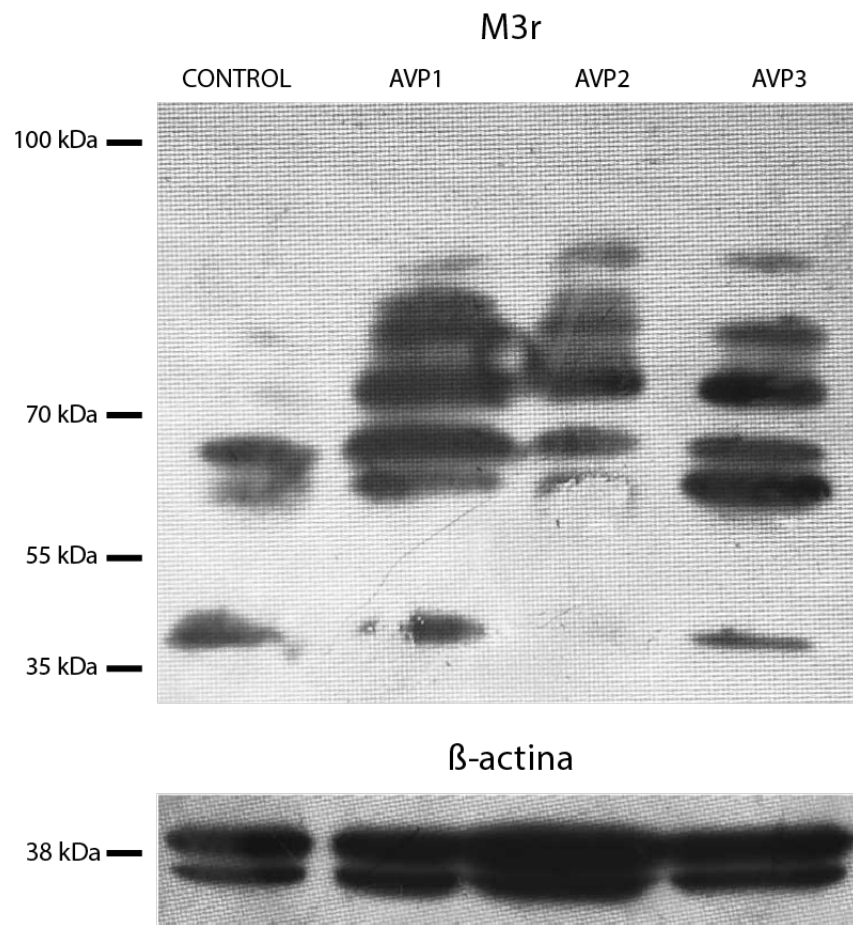


Figura 8: Detección de M3R en muestras de intestino. Las proteínas provenientes de muestras de intestino se marcaron con anticuerpo anti-M3 posterior a su separación por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Se observa un patrón diferencial de quimioluminiscencia en las muestras provenientes de animales expuestos al AVP con respecto a aquella proveniente de una rata control. La membrana se incubó posteriormente para detectar β -actina como control de carga. La imagen es representativa de 1 animal control y 3 animales AVP.

Referencias

- [1] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Association, mayo de 2013, pág. 991. ISBN: 0-89042-555-8. DOI: 10.1176/appi.books.9780890425596. URL: <https://dsm.psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596><https://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- [2] Catherine Lord y col. "Autism spectrum disorder". En: Nature Reviews Disease Primers 6 (1 ene. de 2020), págs. 1-23. ISSN: 2056676X. DOI: 10.1038/s41572-019-0138-4.
- [3] Leo Kanner. "Autistic disturbances of affective contact Nerv. Child.1943;2:217-50." En: Nerv Child (1943).
- [4] Catherine Lord y col. "Autism spectrum disorder". En: The Lancet 392 (10146 ago. de 2018), págs. 508-520. ISSN: 01406736. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31129-2. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618311292><https://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- [5] Angelo y Everaers RalfRosa. "Diagnosis of Autism Spectrum Disorder After Age 5 in Children Evaluated Longitudinally Since Infancy". En: Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 57 (11 nov. de 2018), 849-857.e2. ISSN: 08908567. DOI: 10.1016/j.jaac.2018.06.022. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890856718312875>.
- [6] A. J. Baxter y col. "The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders". En: Psychological Medicine 45 (3 2015), págs. 601-613. ISSN: 14698978. DOI: 10.1017/S003329171400172X.
- [7] Craig J. Newschaffer y col. "The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders". En: Annual Review of Public Health 28 (1 abr. de 2007), págs. 235-258. ISSN: 0163-7525. DOI: 10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16321-5_2<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007>.
- [8] Rachel Loomes, Laura Hull y William Polmear Locke Mandy. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. 2017. DOI: 10.1016/j.jaac.2017.03.013.
- [9] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica 2018. <https://www.inegi.org.mx/programas/enadid/2018/>. Accesado el 10.08.2020. 2018.
- [10] Eric Fombonne y col. "Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey". En: Journal of Autism and Developmental Disorders 46 (5 mayo de 2016), págs. 1669-1685. ISSN: 0162-3257. DOI: 10.1007/s10803-016-2696-6. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s10803-016-2696-6>.
- [11] Alexandra Ure y col. "Autism: One or many spectrums?" En: Journal of Paediatrics and Child Health 54 (10 2018), págs. 1068-1072. ISSN: 14401754. DOI: 10.1111/jpc.14176.

- [12] M. Parellada y col. "The neurobiology of autism spectrum disorders". En: *European Psychiatry* 29 (1 ene. de 2014), págs. 11-19. ISSN: 09249338. DOI: 10.1016/j.eurpsy.2013.02.005. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924933813000217>.
- [13] Amirhossein Modabbernia, Eva Velthorst y Abraham Reichenberg. "Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses". En: *Molecular Autism* 8 (1 2017), págs. 1-16. ISSN: 20402392. DOI: 10.1186/s13229-017-0121-4.
- [14] S J Moore y col. "A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes." En: *Journal of medical genetics* 37 (7 2000), págs. 489-97. ISSN: 1468-6244. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882750><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1734633>.
- [15] Emily Simonoff y col. "Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample." En: *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 47 (8 2008), págs. 921-9. ISSN: 1527-5418. DOI: 10.1097/CHI.0b013e318179964f. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645422>.
- [16] Calliope Hologue y col. "Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence". En: *Autism Research* 11 (1 ene. de 2018), págs. 24-36. ISSN: 19393792. DOI: 10.1002/aur.1854. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/aur.1854>.
- [17] Karoly Horvath y col. "Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder". En: *The Journal of Pediatrics* 135 (5 nov. de 1999), págs. 559-563. ISSN: 00223476. DOI: 10.1016/S0022-3476(99)70052-1. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347699700521>.
- [18] Troy Vargason, Deborah L. McGuinness y Juergen Hahn. "Gastrointestinal Symptoms and Oral Antibiotic Use in Children with Autism Spectrum Disorder: Retrospective Analysis of a Privately Insured U.S. Population". En: *Journal of Autism and Developmental Disorders* 49 (2 2019), págs. 647-659. ISSN: 15733432. DOI: 10.1007/s10803-018-3743-2. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-018-3743-2>.
- [19] Laura A. Schieve y col. "Concurrent medical conditions and health care use and needs among children with learning and behavioral developmental disabilities, National Health Interview Survey, 2006-2010". En: *Research in Developmental Disabilities* 33 (2 2012), págs. 467-476. ISSN: 08914222. DOI: 10.1016/j.ridd.2011.10.008. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ridd.2011.10.008>.
- [20] B. O. McElhanon y col. "Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis". En: *Pediatrics* 133 (5 2014), págs. 872-883. ISSN: 0031-4005. DOI: 10.1542/peds.2013-3995. URL: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2013-3995>.
- [21] Kelli C. Dominick y col. "Atypical behaviors in children with autism and children with a history of language impairment". En: *Research in Developmental Disabilities* 28 (2 2007), págs. 145-162. ISSN: 08914222. DOI: 10.1016/j.ridd.2006.02.003.

- [22] John B. Furness. "The enteric nervous system and neurogastroenterology". En: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9 (5 mayo de 2012), págs. 286-294. ISSN: 1759-5045. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.32. URL: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.32>.
- [23] Vladimir Grubišić y Brian D. Gulbransen. *Enteric glia: the most alimentary of all glia*. Vol. 595. 2017, págs. 557-570. ISBN: 0443007306. DOI: 10.1113/JP271021.
- [24] Andrea M. Harrington, John M. Hutson y Bridget R. Southwell. "Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system". En: *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 44 (4 2010), págs. 173-202. ISSN: 00796336. DOI: 10.1016/j.proghi.2009.10.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proghi.2009.10.001>.
- [25] Wilhelm Feldberg Henry Dale y Marthe Vogt. "Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings." En: *The Journal of Physiology* (May 1936). DOI: 10.1113/jphysiol.1936.sp003371.
- [26] S. J.H. Brookes, P. A. Steele y M. Costa. "Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine". En: *Neuroscience* 42 (3 1991), págs. 863-878. ISSN: 03064522. DOI: 10.1016/0306-4522(91)90050-X.
- [27] Julian Lewis Martin Raff Keith Roberts and Peter Walter Bruce Alberts Alexander Johnson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008. ISBN: 978-0-8153-4105-5.
- [28] Toshimitsu Uchiyama y Russell Chess-Williams. "Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract". En: *Journal of Smooth Muscle Research* 40 (6 2004), págs. 237-247. ISSN: 0916-8737. DOI: 10.1540/jsmr.40.237. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsmr/40/6/40_6_237/_article.
- [29] John Barton Furness. *Enteric nervous system*. Blackwell Publishing, 2006, pág. 291. ISBN: 978-1-4051-3376-033760.
- [30] Lin Du y col. "Behavioral improvements in a valproic acid rat model of autism following vitamin D supplementation". En: *Psychiatry Research* 253 (1 jul. de 2017), págs. 28-32. ISSN: 01651781. DOI: 10.1016/j.psychres.2017.03.003. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016517811631424X>.
- [31] M. Gottlicher. "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells". En: *The EMBO Journal* 20 (24 dic. de 2001), págs. 6969-6978. ISSN: 14602075. DOI: 10.1093/emboj/20.24.6969. URL: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/20.24.6969>.
- [32] George C. Wagner y col. "A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate". En: *Journal of Autism and Developmental Disorders* 36 (6 2006), págs. 779-793. ISSN: 01623257. DOI: 10.1007/s10803-006-0117-y.

- [33] Tomasz Schneider y col. "Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid". En: *Psychoneuroendocrinology* 33 (6 2008), págs. 728-740. ISSN: 03064530. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.011.
- [34] Ji-Woon Kim y col. "Gastrointestinal tract abnormalities induced by prenatal valproic Acid exposure in rat offspring." En: *Toxicological research* 29 (3 2013), págs. 173-9. ISSN: 1976-8257. DOI: 10.5487/TR.2013.29.3.173. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3877996>.
- [35] Golan Karvat y Tali Kimchi. "Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social Deficiency in a Mouse Model of Autism". En: 39 (4 2013), págs. 831-840. ISSN: 0893-133X. DOI: 10.1038/npp.2013.274. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.274>.
- [36] Dayna N Ibáñez-Sandoval. "Alteraciones en el sistema colinérgico del estriado en un modelo de autismo en rata". UASLP, 2016.
- [37] Tania Rinaldi, Catherine Perrodin y Henry Markram. "Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic acid animal model of autism". En: *Frontiers in Neural Circuits* 2 (OCT 2008), págs. 1-7. ISSN: 16625110. DOI: 10.3389/neuro.04.004.2008.
- [38] Ricardo Velázquez-Contreras. Path recorder (v0.1-alpha) [Software de computadora]. <https://github.com/rivelco/Lab-Coding/tree/master/Path-recorder>. Accesado el 04-09-2020. 2019.
- [39] Ricardo Velázquez-Contreras. Activity test counter (v0.5.1) [Software de computadora]. <https://github.com/rivelco/LC-Activity-test-counter>. Accesado el 04-09-2020. 2020.
- [40] Tomasz Schneider y Ryszard Przewłocki. "Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism". En: *Neuropsychopharmacology* 30 (1 ene. de 2005), págs. 80-89. ISSN: 0893-133X. DOI: 10.1038/sj.npp.1300518. URL: <http://www.nature.com/articles/1300518>.
- [41] M. E. Bringas y col. "Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder". En: *Neuroscience* 241 (2013), págs. 170-187. ISSN: 03064522. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.030.
- [42] Kamila Markram y Henry Markram. "The intense world theory - A unifying theory of the neurobiology of autism". En: *Frontiers in Human Neuroscience* 4 (December 2010), págs. 1-29. ISSN: 16625161. DOI: 10.3389/fnhum.2010.00224.
- [43] David M. James y col. "Intestinal dysmotility in a zebrafish (Danio rerio) shank3a;shank3b mutant model of autism". En: *Molecular Autism* 10 (1 dic. de 2019), pág. 3. ISSN: 2040-2392. DOI: 10.1186/s13229-018-0250-4. URL: <https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-018-0250-4>.

- [44] Yasuyuki Tanahashi y col. "Further characterization of the synergistic activation mechanism of cationic channels by M₂ and M₃ muscarinic receptors in mouse intestinal smooth muscle cells". En: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 318 (3 mar. de 2020), págs. C514-C523. ISSN: 0363-6143. DOI: 10.1152/ajpcell.00277.2019. URL: <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf><https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00277.2019>.
- [45] Jianxin Hu y col. "Structural aspects of M₃ muscarinic acetylcholine receptor dimer formation and activation". En: *The FASEB Journal* 26 (2 2012), págs. 604-616. ISSN: 0892-6638. DOI: 10.1096/fj.11-191510.
- [46] Takaji Kondo y col. "Muscarinic receptor subtypes involved in regulation of colonic motility in mice: Functional studies using muscarinic receptor-deficient mice". En: *European Journal of Pharmacology* 670 (1 2011), págs. 236-243. ISSN: 00142999. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.08.034. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.034>.
- [47] Sara Marsango y col. "Muscarinic receptor oligomerization". En: *Neuropharmacology* 136 (2018), págs. 401-410. ISSN: 18737064. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.023>.
- [48] Sara M. McMillin y col. "Structural Basis of M₃ Muscarinic Receptor Dimer/Oligomer Formation". En: *Journal of Biological Chemistry* 286 (32 ago. de 2011), págs. 28584-28598. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M111.259788. URL: <http://www.jbc.org/http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.259788>.
- [49] Jianxin Hu y col. "Novel Structural and Functional Insights into M₃ Muscarinic Receptor Dimer/Oligomer Formation". En: *Journal of Biological Chemistry* 288 (48 nov. de 2013), págs. 34777-34790. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M113.503714. URL: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M113.503714>.