

Tesis Doctoral

# Alteraciones periféricas y centrales en la respuesta inflamatoria en un modelo de autismo en ratón

Lucchina, Luciana

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lucchina, Luciana. (2014). Alteraciones periféricas y centrales en la respuesta inflamatoria en un modelo de autismo en ratón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Lucchina, Luciana. "Alteraciones periféricas y centrales en la respuesta inflamatoria en un modelo de autismo en ratón". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Alteraciones periféricas y centrales en la  
respuesta inflamatoria en un modelo de autismo en  
ratón.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Luciana Lucchina

Directora de tesis: Dra. Amaicha Mara Depino

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y  
Neurociencias, CONICET. Departamento de Departamento de Fisiología,  
Biología Molecular y Celular, FCEN-UBA

Buenos Aires, 2014

## Alteraciones periféricas y centrales en la respuesta inflamatoria en un modelo de autismo en ratón.

### **RESUMEN**

El autismo es un desorden severo del desarrollo neural que se encuentra principalmente caracterizado por un impedimento sostenido en la interacción social, habilidades comunicativas reducidas y por patrones de comportamiento estereotipados o restrictivos. Existen cada vez más evidencias clínicas y experimentales que relacionan alteraciones en el sistema inmune con la patogénesis del desorden de espectro autista (DEA). Los individuos autistas muestran en diversas etapas de su desarrollo signos de neuroinflamación, respuestas inflamatorias alteradas y anomalías inmunes.

El objetivo general de esta tesis fue el de estudiar el rol que juega la respuesta inflamatoria/gliol del sistema nervioso central en la manifestación de comportamientos relacionados con el autismo. A tal fin utilizamos ratones expuestos en la preñez a 600 mg/kg de ácido valproico (VPA600), los cuales muestran deficiencias en la interacción social y han sido propuestos como un posible modelo de autismo. En este trabajo no sólo confirmamos el fenotipo en una filial 1 (F1) de dos cepas endocriadas de ratón, sino que extendimos el análisis conductual describiendo que los animales expuestos a VPA muestran niveles aumentados de comportamientos relacionados con la ansiedad.

Evaluamos en estos animales la respuesta periférica y central a un estímulo inflamatorio, así como el estado basal de activación gliol. Evidenciamos signos de activación gliol crónica tanto en el hipocampo como en el cerebelo de los animales VPA600, así como una respuesta exacerbada al ser expuestos a un estímulo inflamatorio periférico (lipopolisacárido intraperitoneal, LPS): los animales VPA600 muestran niveles más altos de corticosterona en sangre y un aumento en los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el bazo respecto de animales control. Sumado a esto, luego del estímulo con LPS los VPA600 muestran signos de neuroinflamación: tienen mayor número de células de la microglia en el

hipocampo y exhiben mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebelo.

A fin de evaluar la posible relación causal entre la neuroinflamación observada en el cerebro adulto de los animales expuestos a VPA y la disminución en la interacción social, inyectamos LPS directamente en el lobulillo VI-VII del cerebelo. Al evaluar el comportamiento a las 24 horas, observamos una disminución en la interacción social, acompañada de una marcada neuroinflamación.

Los resultados que se presentan demuestran, por un lado, una neuroinflamación basal y una respuesta inflamatoria alterada en el modelo VPA de autismo y, por otro, sugieren que la inflamación en una región específica del cerebelo puede modular los niveles de interacción social. Teniendo ambas cosas en cuenta, proponemos a este modelo como una herramienta útil para evaluar la contribución de la inflamación al desarrollo de los comportamientos relacionados con el autismo. Consideramos que estos estudios contribuirán a dilucidar el rol de las desregulaciones inflamatorias observadas en individuos con ASD.

**Palabras clave:** ácido valproico, autismo, cerebelo, comportamiento, modelo animal, neuroinflamación.

# Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism

## **ABSTRACT**

Autism is a severe neurodevelopmental disorder, characterized by impairment in social interactions, communication deficits and restricted repetitive and stereotyped interests and behaviors. There are clinical and experimental evidences linking alterations in the immune system and the pathogenesis of autism spectrum disorder (ASD). Autistic individuals show signs of neuroinflammation, altered inflammatory responses and immune abnormalities.

The main aim of this thesis was to study the role of the inflammatory/glial response of the central nervous system on the manifestation of autism-related behaviors. To this aim, we used mice prenatally exposed to 600 mg/kg valproic acid (VPA600), which show reduced social interaction in adulthood and have been proposed as a mouse model of autism. In this work, we not only confirmed the phenotype in a F1 obtained from two inbred mouse strains, but we also extended the behavioral analysis describing that animals prenatally exposed to VPA also show increased anxiety-related behaviors.

In these animals we evaluated the peripheral and central response to an inflammatory stimulus, along with the basal activation state of the glia. We found evidence of chronic glial activation in the hippocampus and the cerebellum of VPA600 animals, accompanied by an exacerbated response when they were challenged with a peripheral inflammatory stimulus (intraperitoneal lipopolysaccharides, LPS): VPA600 animals secrete more corticosterone to the blood and show increased levels of expression of proinflammatory cytokines in the spleen than control mice. Moreover, after a LPS challenge, VPA600 mice also show signs of increased neuroinflammation compared with control mice: they have more microglial cells in the hippocampus, and they show higher levels of proinflammatory cytokines in the cerebellum.

To assess the possible causal relationship between the neuroinflammation observed in the adult brain of VPA-exposed animals and the deficit in social interaction, we injected LPS directly into the lobule VI-VII of the cerebellum. 24 hours after injection, we analyzed the behavior and we observed a decrease in social interaction, accompanied by an evident neuroinflammation

These results demonstrate, on the one hand, a basal neuroinflammation and altered inflammatory response in the VPA model of autism and, on the other hand, they suggest that inflammation in a specific region of the cerebellum can modulate the levels of social interaction. Taking both into account, we propose this model as a useful tool to evaluate the contribution of inflammation to the development of autism-related behaviors. We believe that these studies will help elucidate the role of the inflammatory alterations observed in individuals with ASD.

**Keywords:** animal model, autism, behavior, cerebellum, valproic acid, neuroinflammation.

*A todos los que perciben el mundo desde  
una perspectiva distinta.*

# Agradecimientos

---

Gracias.

Al CONICET, porque me permitió hacer un doctorado, aprender, equivocarme, experimentar. Porque es impensable e imposible un país que progrese sin un organismo serio de Ciencia y Técnica.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, una institución a la que me enorgullece pertenecer, un lugar lleno de personas que trabajan infinitamente para que sea lo que es, e incluso sea mejor.

A mi directora, a quien admiro por su manera de trabajar y por su capacidad de formar un laboratorio desde cero, donde todos contribuimos a fin de poder contar UNA historia. Porque puede ser buena directora, buena docente, puede escribir libros para chicos y mil cosas más y nunca parece estar a las corridas. Espero poder trabajar al menos un poquito como vos alguna vez. Gracias por estos tantos años (¡7!).

A mi co-director de beca, porque desde el primer momento me dio el lugar en su laboratorio y el apoyo y el consejo, siempre e independientemente de mi lugar de trabajo. A los compañeros y amigos de ese laboratorio, con los cuales compartí parte de mi camino por la ciencia: a Mariela, Pato, Marian, Verito, Pablo, Ana Paula, Vale, Rodolfo, Carina. A Isa y a Joaquín. A toda la gente que trabaja en el Instituto Leloir y, especialmente, a los amigos moscólogos.

A mi consejera de estudio (y no solo de estudio), Lidia Szczupak, la persona más querible del mundo de la neurociencia argentina.

Al jurado, por tomarse el tiempo de leer y evaluar críticamente este trabajo, seguro mejorándolo.

A mis compañeritos de grupo, mis hermanos menores, con los que pude compartir problemas de laboratorio, de ratones y de inyecciones. A



Marcos, el chico más lindo del grupo (ejem!): gracias por ponerle siempre paños fríos a mis angustias sobre el futuro. A Nadia, con su risa que contagia, con sus rulos que divierten: gracias porque cada vez que te quise enganchar en algo, te dejaste enganchar.

A mis compañeros del Arco de Enfrente, de "al lado del kiosco" o del labo sin nombre. Un placer compartir este tiempo con ustedes. Gente que entusiasma, que colabora, que desborda pasión por lo que hace. Gracias a los experimentados (Fer, Tincho y Rami) y a los jóvenes entusiastas (Angie, Martincito, Emi, Mechi y Alan): por escuchar, por compartir, por aconsejar, por ser personas tan predispuestas a dar una mano en cualquier momento.

En especial, gracias a Mechi linda, Mechi sonriente, Mechi colorida, por regalarme tu amistad desde el primer momento que entré en el labo. Por mates y charlas tempranito, por bailes, ensayos y muestras.

Y gracias a Alan, un amigo de antes, de ahora y me atrevo a decir, de siempre. Tuve la suerte de compartir un espacio de trabajo con vos y aprendí de tu concentración y de tu generosidad para compartir ese don de comprensión, capacidad y grositud que tenés.

Gracias al laboratorio de Neurobiología de la Memoria. Porque son una familia y nos adoptaron. Para discutir ciencia, para compartir tortas, para festejar el trabajo y la vida. Gracias en general y en particular a cada uno de ustedes.

A los BET; si "mal de muchos, consuelo de tontos", yo soy una tonta. Saber que alguien más estaba atornillado a la silla, frente a la computadora, un fin de semana de pleno sol, me hizo sentir acompañada. Gracias a Vani y Pablo por hacer de su casa una sede alegre de escritura. Gracias a todos por dar consejos, por tomarse el tiempo de explicar trámites, por hacer tutoriales, por festejar cada éxito de los otros, dar ánimo y ser copados. A los ya doctores, ¡felicitaciones! A los que les queda aún un trecho, ¡fuerza, se llega!

Gracias a todos los amigos y compañeros que hicieron que durante estos 5 años, mi vida sea más linda. Eso para mí resulta inseparable de este doctorado.

Gracias a Andrea, la hermana que esta carrera me regaló, a Carmen, siempre con un abrazo a flor de piel y una invitación a la Noriega. Gracias a mis amigos y habitantes de Monroe: Flor y Guille. Gracias a Nico, a Mariela, a Elisa, a Clari. Gracias a los mejores amigos de la neurociencia y de la vida: Ana, Jose y Beck. Gracias a Marian (presente aun a la distancia) y a todas las genéticas...todos han escuchado parte de esta historia y todos han apoyado, aconsejado o simplemente, han reído conmigo. Gracias también a las amigas de la vida, a Lali, a Ceci, a Paula. Por ser. Por estar.

Gracias a toda la gente con la que cursé, charlé, discutí, aprendí estos 5 años. A la gente con la que hicimos el taller del Sótano, a la gente de Ciencia Itinerante y a Meli Furman, por confiar en un proyecto y enseñarme a escribirlo.

Gracias a los patos. Porque el agua es un espacio que disfruto, y con ustedes, aún más. Gracias a Eli y a Rodri, que son los artífices de la cosa mejor hecha que conozco. Admiro la pasión, las ganas y la energía que ponen en esto que hacen. Gracias a José, que siempre tiene una sonrisa para regalar y una capacidad infinita de identificar cuando exigir y cuando parar. Gracias a Maru, que aun sin serlo fue un poquito mi profesora. Gracias a todos los integrante de esta gran familia, pero en especial, a mis compañeros y amigos: el osito, el pececito, el intenso, la risueña Sabri y las ex-temerosas y actuales temerarias, ejemplos de superación: Susi y Rosa. Gracias a Cynthia, que me los dio a conocer un día en el pasillo de la facu, diciéndome: "no es porque sea de mi hermana, pero es la mejor escuela de natación a la que podés ir". Y era cierto.

Gracias a Laura, a los orixás y a mis compañeras. Por ayudarme a encontrar un espacio de baile y expresión, que me permite explorar lugares de rabia y de dulzura, de fuerza y de análisis, de dolor y de alegría. Porque los martes y los sábados son días esperados y felices.

Gracias a mi familia que está ahí, de respaldo, de apoyo, siempre. Gracias a mis hermanas, que son una de las cosas más divertidas que la vida me regaló. Gracias a Juli por hacerme tía de los dos sobrinos más lindos del mundo. Y a los que se van sumando a esta familia: a las parejas de mis padres, a mis cuñados, a los Pinedo.

Finalmente, gracias a quien me permitió volver a creer en el amor, en los proyectos de a dos, en la vida en común. A quien relativizó los dramas y las alegrías del laboratorio, escuchó varias veces los misterios del VPA y la interacción social, compartió las angustias y ansiedades sobre el futuro e hizo que todo eso no importase a la hora de comenzar y terminar cada día.

Una partecita de mi título te corresponde. ¡Gracias Pinedo!

# Abreviaturas

---

**ABC:** Complejo avidina biotina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN copia

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**BSA:** Albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

**DAB:** 3,3' -diaminobenzidina

**DEA:** Desorden de espectro autista

**DE:** Desvío estándar

**DG:** Día gestacional

**DP:** Día postnatal

**EE:** Error estándar

**EPM:** laberinto elevado en cruz, del inglés *elevated plus maze*

**GFAP:** Proteína fibrilar ácida glial

**HPA:** Hipotálamo-hipófisis-adrenal

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina 1 beta

**IL-6:** Interleuquina 6

**i.p.:** Intraperitoneal

**LPS:** Lipopolisacárido bacteriano

**OF:** Ensayo de campo abierto, de inglés *open field*

**PB:** Buffer fosfato

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

**rpm:** Revoluciones por minuto

**SI:** Ensayo de interacción social, del inglés *social interaction*

**SNC:** Sistema nervioso central

**s.c.:** Subcutánea

**TBS:** Buffer tris salino

**TS:** Ensayo de suspensión por la cola, del inglés *tail suspension*

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de crecimiento transformante beta 1

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alpha.

**Tx:** Detergente Tritón x-100

**X:** Media aritmética

---

# Índice

---

Resumen .....	2
Abstract .....	4
Agradecimientos .....	7
Abreviaturas .....	11
Índice.....	13
Capítulo I-Introducción.....	17
I.1 De qué hablamos cuando hablamos de autismo .....	18
I.2 Autismo... ¿un rompecabezas? .....	19
I.3 Diagnóstico: Alteraciones principales.....	21
I.4 Ansiedad y depresión: ¿alteraciones asociadas o co-existentes?..	23
I.5 Neuropatología .....	25
I.6 Factores etiológicos.....	28
I.6.1 Factores genéticos.....	29
I.6.2 Factores ambientales .....	32
I.7 Neuroinflamación y autismo .....	36
I.7.1 Células de la glia .....	38
I.7.2 Citoquinas .....	43
I.7.3 Glia y citoquinas en el autismo.....	44
I.8 Modelos animales de autismo .....	46
I.8.1 Modelos genéticos .....	47

---

I.8.2 Modelos ambientales .....	49
Hipótesis y objetivos .....	57
Capítulo II-Materiales y Métodos.....	59
II.1 Animales .....	60
II.1.1 Tratamiento de progenitores.....	60
II.1.2 Crías F1 .....	62
II.1.3 Ratones CrIFcen: CF1 .....	63
II.2 Inyecciones.....	63
II.2.1 Inyecciones de VPA .....	63
II.2.2 Inyecciones en la adultez .....	64
II.2.3 Inyección en el cerebelo.....	65
II.3 Comportamiento.....	66
II.3.1 Comportamiento de crías .....	66
II.3.2 Comportamiento de animales adultos .....	67
II.3.3 Selección de animales de baja y alta interacción social.....	74
II.4 Radioinmunoensayo .....	75
II.5 Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real..	77
II.6 Procesamiento de tejidos para histología .....	79
II.6.1 Tinción con violeta de cresilo .....	79
II.6.2 Inmunohistoquímicas.....	80
II.7 Cuantificaciones .....	82
II.7.1 Estereología .....	82
II.7.2 Estimación del área GFAP-positiva.....	83

II.7.3. Cuantificación de c-fos.....	84
II.7.4 Análisis de la inflamación en el cerebelo.....	84
II.8 Estadística .....	85
Capítulo III-Resultados: Caracterización conductual del modelo VPA. .....	87
III.1 Punto de inicio .....	88
III.3 Desarrollo de las crías.....	90
III.4 Comportamiento de las crías.....	91
III.4.1 Enderezamiento sobre una superficie.....	91
III.4.2 Fuerza de agarre.....	92
III.4.3 Locomoción en un ambiente novedoso.....	93
III.5 Comportamiento de adultos .....	93
III.5.1 Interacción social.....	93
III.5.3 Síntomas relacionados: Comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión en el modelo de VPA.....	96
III.6 ¿VPA como estímulo inflamatorio? .....	100
III.7 Conclusiones.....	101
Capítulo IV-Resultados: Alteraciones periféricas y centrales en la respuesta inflamatoria en el modelo VPA. ....	105
IV.1 Punto de inicio.....	106
IV.2 Diseño Experimental .....	106
IV.3 Efecto de un estímulo inflamatorio en la periferia.....	107
IV.3.1 Sobre el perfil de expresión de citoquinas.....	107
IV.3.2 Sobre el eje HPA .....	109



IV.4 Efecto de un estímulo inflamatorio en el sistema nervioso central .....	109
IV.4.1 Respuesta Molecular .....	109
IV.4.2 Respuesta celular .....	113
IV.4.3 Comunicación periferia-SNC central .....	127
IV.5 Conclusiones .....	129
Capítulo V-Resultados: Relaciones entre el fenotipo comportamental, la presencia de neuroinflamación y la respuesta exacerbada del eje HPA. ....	135
V.1 Punto de inicio .....	136
V.2 Análisis correlacional .....	136
V.3 Prueba de concepto .....	138
V.4 Conclusiones .....	149
Capítulo VI-Discusión y Conclusiones .....	155
VI.1 Discusión general.....	156
VI.1.1 Modelos de activación inmune materna .....	157
VI.1.2 Sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en el hipocampo.....	159
VI.1.3 Cepa de ratones BTBRT+ tf/J. ....	160
VI.1.4 Ratones nulos para el gen CX3Cr1 .....	161
VI.1.5 Modelo de ácido valproico.....	162
VI.1.6 Modelo de ácido propiónico .....	163
VI.2 Conclusiones finales .....	163
Capítulo VII-Referencias Bibliográficas.....	168
VIII-Publicaciones.....	202

# Capítulo I-Introducción

---

## I.1 De qué hablamos cuando hablamos de autismo

En general, nos referimos a autismo cuando queremos hablar del *desorden o trastorno de espectro autista*. Este es un trastorno del desarrollo definido solo comportamentalmente y las personas autistas presentan esta condición de por vida.

El término autista fue acuñado en 1943 por Leo Kanner (Kanner, 1943), un psiquiatra nacido en Austria y educado en Berlín. La descripción detallada del desorden hecha a partir de 11 niños sigue siendo válida hoy en día. Lo que ya no se considera válido es la etiología propuesta: caracterizó el desorden como "una perturbación autista innata del contacto afectivo" debida a la falta de calidez de los padres, de las madres en particular, por lo que se popularizó el término *madres refrigeradoras*. En 1954 había recolectado observaciones de 100 casos y llegó a la conclusión de que la insuficiencia en la crianza por parte de madres frías y padres poco demostrativos, pertenecientes a una clase muy educada, eran en gran parte responsables del autismo de sus hijos (Kanner, 1954).

Al menos 30 años tuvieron que pasar para que la evidencia acumulada fuese suficiente para refutar la teoría de las madres refrigeradoras. Si bien ya en 1964 Bernard Rimland, psicólogo estadounidense y padre de un hijo con autismo, tras revisar toda la literatura existente había propuesto que el desorden era de carácter biológico, fueron dos los eventos responsables de empujar al autismo desde el diván del psiquiatra hacia el consultorio del neurólogo. El primero fue la epidemia de rubeola de 1964, que dejó un alto número de niños con autismo (Chess, 1977). El segundo fue la evidencia que mostró que un tercio de las personas con autismo también desarrollan epilepsia (Deykin, 1979). Ambos hechos le dieron fuerza a la hipótesis de que el autismo era un desorden del cerebro y no de la psiquis.

En 1980 fue incorporado al Manual Estadístico de Diagnóstico (DSM-3era edición), herramienta para clasificar los trastornos neuropsiquiátricos,

y desde ese momento a la actualidad constantemente se están redefiniendo y delimitando las características que debe tener una persona para entrar dentro de la categoría "autista"; de hecho, hubo cambios en la clasificación en cada nueva edición del DSM. La clasificación brindada por la quinta y nueva edición del DSM (DSM-5), terminada a principios del 2013, sigue siendo muy cuestionada. Previamente se hablaba de 4 desórdenes del desarrollo independientes: desorden autista, síndrome de Asperger, desorden generalizado del desarrollo sin especificar (PDD-NOS) y desorden desintegrador de la niñez. Hoy, el DSM-5 une a los 4 en la misma categoría, colocándoles la misma etiqueta: desorden de espectro autista (DEA). El razonamiento para este cambio es que estos desórdenes muestran esencialmente los mismos síntomas, diferenciándose solamente en grados de severidad. Estos síntomas son el déficit en el lenguaje, el déficit en la interacción social y la presencia de movimientos repetitivos y estereotipados.

## I.2 Autismo... ¿un rompecabezas?

Una comprensión acabada de lo que sucede a personas con DEA requiere de un conocimiento avanzado de la estructura cerebral y de su función a múltiples niveles de análisis. Mucho de lo que se sabe hoy del autismo deriva directamente de la investigación clínica de niños afectados y de la familia cercana, o del análisis de tejido post-mortem de individuos afectados. El símbolo que se usa para identificar al desorden (un rompecabezas, figura I.1) ilustra muy bien los resultados que se obtienen a partir de esa investigación: una cantidad de datos descriptivos que, tal como piezas de un rompecabezas, se desconoce cómo encastran unos con otros. Por ejemplo, estudios post-mortem y estudios de resonancia magnética (MRI) han permitido identificar anomalías en varias estructuras corticales y subcorticales (Courchesne y Pierce, 2005), mientras que estudios neurofisiológicos han implicado impedimentos específicos en el

procesamiento de la información social y emocional (Dawson et al., 2004). Estos hallazgos son piezas que identifican parte de lo que se encuentra alterado en el desarrollo cerebral de personas con autismo, pero se desconoce cómo se relacionan unas con otras.

Buscando responsables, existen varios sistemas neurales que son candidatos naturales: sistemas que regulan el comportamiento social, sistemas de alta jerarquía cognitiva, comunicación, miedo, atención, ansiedad. Estos sistemas involucran circuitos que integran información procesada en la corteza cerebral, los ganglios de la base, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo y el cerebelo, y son modulados por sistemas monoaminérgicos subcorticales.



**Figura I.1. Símbolo internacional del autismo.** Se muestra el patrón con el que se identifica el desorden: un rompecabezas con piezas de colores que representa la complejidad y multiplicidad de causas del DEA. Este patrón fue diseñado en 1963 y es usado desde entonces por la Sociedad de Autismo estadounidense, fundada por el Dr. Bernard Rimland, psicólogo y padre de un niño autista, con el objetivo de aumentar la conciencia sobre el desorden.

Para complejizar aun más la investigación, no debemos olvidar un concepto clave: la HETEROGENEIDAD. Esta heterogeneidad la encontramos de manera transversal en todos los niveles que estudiemos del desorden: expresión de los síntomas, síntomas asociados, neuropatofisiología y etiología.

Pocas piezas y mezcladas, eso es lo que como comunidad científica tenemos hasta el momento, y es lo que ha generado una multiplicidad de pequeñas hipótesis sobre el DEA, la mayoría de las cuales aun deben ser puestas a prueba.

### I.3 Diagnóstico: Alteraciones principales

En el 2009, el centro para el control de enfermedades norteamericano (CDC) y distintos grupos en el mundo indicaban que este desorden afectaba a 1 de cada 100-200 niños nacidos (Baron-Cohen et al., 2009; Kogan et al., 2009) dependiendo del país, con una relación varones:mujeres de 4:1, lo que convertía a este desorden en uno de los de más alta incidencia en niños en los países desarrollados. Nuevos informes indican una prevalencia de 1 en 50 (Blumberg et al., 2013). La rapidez con la que aumenta este número es alarmante, aunque se desconoce y se discute hoy si este aumento indica un crecimiento real de la prevalencia o bien una mejora en el diagnóstico, debido a una mayor conciencia sobre la enfermedad, e incluso, en algunos casos, un sobre-diagnóstico (Wing y Potter, 2002; Fombonne, 2008).

El DSM-5 indica que para ser diagnosticado con autismo un individuo debe mostrar los síntomas de los grupos A, B, C y D:

A. Déficits persistentes en la comunicación social y en las interacciones sociales que se evidencien en distintos contextos y que no se expliquen por retrasos generales en el desarrollo. Deben manifestarse los siguientes 3:

1. Déficits en la reciprocidad socio-emocional, que van desde una interacción social anormal debida a fallas en la conversación de ida y vuelta, reducción en el deseo de compartir intereses, emociones y/o afecto, hasta la falta total de iniciativa en entablar alguna interacción social.

2. Déficit en la comunicación no verbal utilizada para la interacción social, que va desde una integración pobre de comportamientos de comunicación verbal y no verbal, debida a anomalías en el contacto visual y en el lenguaje corporal, hasta déficit en la comprensión y el uso de la comunicación no verbal debidos a la ausencia de expresiones faciales.

3. Déficit en el desarrollo y mantenimiento de relaciones interpersonales, de acuerdo con el nivel de desarrollo (sin tener en cuenta a las personas que les proporcionan cuidado), que van desde dificultad de los niños para adaptarse a diferentes contextos sociales debida a dificultades para compartir el juego imaginativo y a hacer amigos, hasta una aparente falta de interés en la gente.

B. Patrones repetitivos y restringidos de comportamiento, intereses o actividades manifestados al menos por dos de los siguientes:

1. El discurso, los movimientos motrices o el uso de objetos se realiza de manera estereotipada y/o repetitiva (comportamientos motrices simples estereotipados, ecolalia o uso repetitivo de objetos o frases).

2. Adhesión excesiva a rutinas, patrones rituales de comportamiento verbal o no verbal, o una excesiva resistencia al cambio (como rituales motrices, la insistencia en un mismo camino o alimentos, preguntas repetitivas o angustia extrema ante pequeños cambios).

3. Interés desmedido u obsesivo en cuestiones normalmente irrelevantes (como fuerte apego o preocupación por objetos poco comunes, intereses circunscriptos a un tema en particular).

4. Hiper o hiporeactividad a estímulos sensoriales o interés inusual en aspectos sensoriales del ambiente (como aparente indiferencia al dolor/calor/frío, o respuestas excesivas ante determinados sonidos o texturas, fascinación por oler o tocar objetos, por luces o por objetos que giran como ruedas o trompos).

C. Los síntomas deben estar presentes en la niñez temprana (pero pueden no manifestarse completamente hasta que la demanda social así se lo exija).

D. Los síntomas al aparecer en conjunto limitan o dificultan el funcionamiento diario y cotidiano.

Para diagnosticar el autismo se utilizan distintas pruebas que constan de preguntas dirigidas hacia los cuidadores del niño, observación e interacción directa entre el especialista y el niño, o una combinación de ambas. Estas pruebas son herramientas clínicas, usadas por profesionales (psiquiatras, psicólogos, pediatras, pedagogos). Algunas de las pruebas utilizadas son la lista de verificación de autismo en niños pequeños (CHAT por sus siglas en inglés) (Baron-Cohen S, 1992), el programa pre-lingüístico de observación de diagnóstico de autismo (PL-ADOS) (DiLavore PC, 1995) y la escala de nivel de autismo en la niñez (CARS) (DiLalla DL, 1994). Esta última es una de las más usadas en investigación, ya que brinda un nivel de gravedad de síntomas y puede ser usada para evaluar la progresión de los síntomas o bien la mejora en el caso de tratamientos o terapias.

#### I.4 Ansiedad y depresión: ¿alteraciones asociadas o co-existentes?

Existe un considerable debate sobre si ciertos desórdenes psicopatológicos que se presentan con alta frecuencia en la población autista deben ser asociados al diagnóstico o si deben ser considerados solo como síntomas co-existentes. Dos de estos desórdenes son la ansiedad y la depresión.

La ansiedad resulta ser una de las alteraciones más comunes, sobre todo entre los niños en edad escolar y en los adolescentes con DEA



(Ghaziuddin et al., 2002). De hecho, Kanner ya lo había notado en su descripción de niños con autismo (Kanner, 1943). Actualmente, la ansiedad no es considerada una característica del autismo dentro de la clasificación del DSM-V.

Los individuos con autismo prefieren el aislamiento social y mantienen un bajo nivel de contacto social. Sin embargo, algunos de estos individuos son conscientes de su desconexión social y parecen desear que esto fuese distinto (Attwood, 2000). En ese contexto, es lógico conjeturar que la conciencia de esta discapacidad podría engendrar ansiedad. La ansiedad no puede ser considerada sólo como un desorden co-existente, ya que si un niño con DEA presenta también desorden de ansiedad, este desorden podría empeorar los síntomas clásicos del autismo. Por ejemplo, la ansiedad social puede contribuir a la evitación de situaciones sociales, a relaciones extrañas con pares y favorecer así el aislamiento (Myles, 2001). Por lo tanto, la ansiedad tiene efectos bidireccionales en la discapacidad social de las personas con DEA y resulta fundamental el desarrollo de un abordaje que permita explorar cómo el desorden de ansiedad se desarrolla e interactúa con las principales alteraciones del DEA.

Con respecto a la depresión, resulta importante distinguir entre un estado depresivo o triste versus el síndrome de depresión. En una muestra pequeña de 20 varones adolescentes con desorden de Asperger (Green et al., 2000), 40% mostraban una infelicidad crónica, pero solo 5% cumplían con los criterios de depresión mayor. Esto está en la misma línea que lo reportado por Hofvander: de un estudio en el que analizaron una muestra de 125 personas con DEA, el 34% había sido tratado alguna vez con antidepresivos, pero no necesariamente por ser diagnosticado con depresión, sino también por trastornos de humor y/o desorden bipolar. Por el contrario, un 46% fue diagnosticado con algún tipo de desorden de ansiedad (Hofvander et al., 2009).

Estos estudios avalan el hecho de que, a pesar de no estar presentes como un síntoma central en el DSM-V (ni en las ediciones anteriores), los

trastornos de ansiedad son un requisito a tildar en algunas de las pruebas diagnósticas para autismo mencionadas anteriormente, y no así la depresión.

## I.5 Neuropatología

Diferentes abordajes, incluyendo la evaluación clínica, estudios de imágenes y estudios neuropatológicos, han sido usados para estudiar las anormalidades estructurales y morfológicas del cerebro de personas con DEA.

Kemper y Bauman fueron los primeros en describir un retraso sutil en el crecimiento de los somas y las dendritas de algunas neuronas del sistema límbico (Bauman y Kemper, 1985). Reportaron también un número reducido de células de Purkinje y células granulares en el cerebelo. Estos hallazgos, fueron ampliados y reconfirmados en subsecuentes trabajos del mismo grupo (Bauman y Kemper, 2003) y dieron comienzo a una gran cantidad de estudios morfométricos sobre el cerebelo, llevando a reconsiderar su rol no sólo en el autismo sino también en otros comportamientos complejos como el lenguaje y la atención (Schmahmann, 2004).

En la línea de análisis morfométricos, otro hallazgo consistente fue la observación de una alteración en el crecimiento del cerebro, documentado extensivamente por Courchesne (Courchesne, 2004). El estudio del tamaño del cerebro se puede realizar midiendo tres variables: la circunferencia de la cabeza, el volumen del cerebro a partir de imágenes de resonancia magnética (MRI) y el peso del cerebro post-mortem. Courchesne llamó la atención sobre la importancia de la edad en que estas variables son estudiadas, ya que las regiones que sufren de un crecimiento acelerado en la infancia, son las mismas que, en algunos individuos, sufren degeneración a medida que el individuo crece. Los cambios relacionados con la edad y la

heterogeneidad en la respuesta a largo término podrían alterar o enmascarar la patología temprana.

Teniendo esto en cuenta, Courchesne trazó una curva de crecimiento, observando que el inicio de la enfermedad parece precedido de dos fases anormales de crecimiento del cerebro: una fase temprana de crecimiento excesivo del cerebro que se da hasta los 6-14 meses de edad, y una fase posterior de enlentecimiento o arresto del crecimiento entre los 2 y los 4 años (Courchesne, 2004; Courchesne et al., 2004). En algunos individuos, incluso, se puede identificar una tercera fase de degeneración, que se daría en la preadolescencia. El patrón de crecimiento anormal del cerebro estaría dado principalmente por anomalías en el crecimiento del lóbulo frontal, el cerebelo y estructuras límbicas (Courchesne, 2004; Courchesne et al., 2004; Schumann et al., 2004; Courchesne y Pierce, 2005). Estas regiones están íntimamente involucradas en el desarrollo de habilidades sociales, de comunicación y motrices, habilidades que se encuentran disminuidas en personas con DEA (Dawson et al., 2002; Smith et al., 2005). Resulta interesante el hecho de que estas regiones normalmente están conectadas y las fibras que las conectan se encuentran disminuidas en personas con DEA. La modificación en la cantidad y distribución de la sustancia blanca genera un anormal patrón de activación y sincronización entre las diferentes regiones, que incluye la reducción de la conectividad funcional y una disminución en el desempeño de tareas que requieren de cierta noción del tiempo, tales como el lenguaje, la memoria de trabajo, la resolución de problemas y las señales no verbales de la interacción social (Minshew y Williams, 2007).

Por el contrario, se observó un volumen mayor de sustancia blanca en el vermis cerebeloso (Noriuchi et al., 2010) y en los distintos lóbulos de los hemisferios cerebrales (mayormente en el lóbulo frontal) dispuesta subcorticalmente y formando axones de proyección cortos (Herbert et al., 2003; Herbert et al., 2004). Casanova ha sugerido que el aumento de la sustancia blanca en esta zona obedece a la necesidad de conexiones de corto alcance entre las mini-columnas (Casanova, 2004). Las mini-columnas

son estrechas cadenas de neuronas que se extienden verticalmente a través de las capas de la corteza II a VI (Mountcastle, 1997) y que constituyen unidades anatómicas y funcionales. Varios elementos anatómicos han sido usados para describir las características morfométricas de las mini-columnas: arreglos de células piramidales, manojos de axones, manojos de dendritas y localización de células en cesta (Casanova, 2007). La característica más usada para estudiarlas es el arreglo de células piramidales. La arquitectura de estos arreglos pareciera estar modificada en pacientes con DEA: las mini-columnas son más numerosas, más pequeñas y menos compactas en su configuración celular, especialmente en la región temporal y frontal (Casanova et al., 2002). Si estas alteraciones resultan en los síntomas conductuales observados en el DEA y de qué manera, es algo que todavía necesita ser dilucidado.

No solo se encuentra modificada la cantidad de sustancia blanca en los pacientes con DEA, también está modificada su calidad. El estudio de la organización, tasa de maduración e integridad estructural de la sustancia blanca fue llevado adelante por medio de una técnica de resonancia magnética conocida como *Imagen Ponderada por Difusión* (Hazlett et al., 2006). Esta técnica permite medir la difusión del agua en el tejido permitiendo estimar la dirección y la densidad de empaquetamiento de los tractos de fibras. En un reciente trabajo, Shukla y colaboradores observaron cambios en esta variable en varias regiones corticales involucradas en el comportamiento social y la integración de la información en participantes de 9-20 años de edad (Shukla et al., 2011).

También se estudió la densidad de dendritas de células piramidales usando el método de Golgi. Los investigadores (Hutsler y Zhang, 2010) observaron evidencia consistente que muestra un aumento en la densidad de espinas en todas las capas de la corteza de las áreas estudiadas y en todo el rango etario investigado (de 10 a 46 años). Estos resultados representan una base estructural sobre la que se sostienen las hipótesis de deficiencia en la calidad de las conexiones cortico-corticales (Hughes, 2007)

y un aumento en las conexiones de corto alcance, como, por ejemplo, de las conexiones entre áreas subcorticales y la corteza (Mizuno et al., 2006).

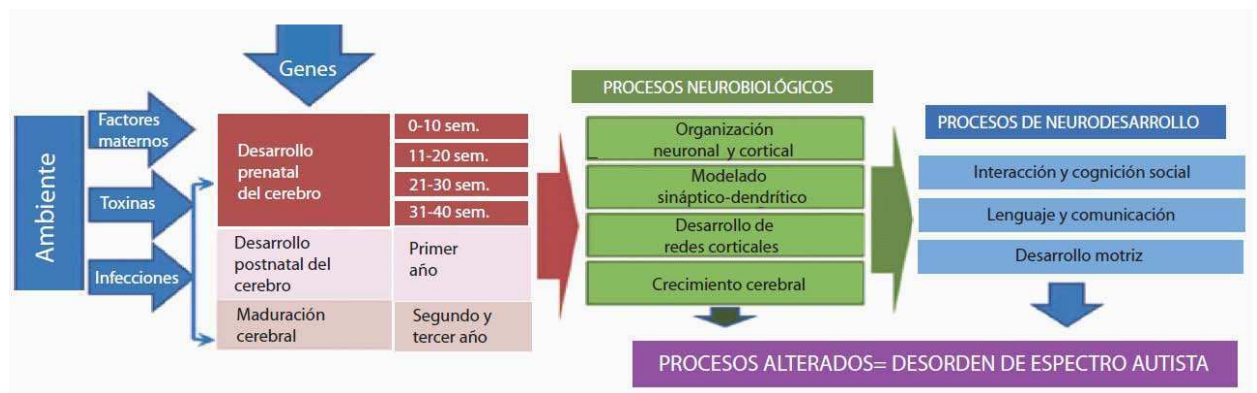
Existen numerosos reportes de otras alteraciones, pero solo hemos mencionado aquí las que tienen un alto nivel de consistencia a lo largo del tiempo y entre distintos grupos. La falta de consistencia de otros reportes puede deberse al bajo poder estadístico de las pruebas usadas debido al pequeño tamaño muestral, a la heterogeneidad propia del desorden, a la diversidad de controles utilizados (población normal, hermanos, otros desórdenes psiquiátricos) o bien a la dificultad de controlar posibles factores que confunden los resultados (presencia de retraso mental, co-ocurrencia con otros desórdenes neuropsiquiátricos, antecedentes de convulsiones o historia médica).

Teniendo en cuenta las alteraciones mencionadas y considerándolas en conjunto con los síntomas, podemos decir que el autismo es un desorden del desarrollo en la organización neuro-cortical que causa alteraciones en el procesamiento de la información a diferentes niveles del sistema nervioso, desde la organización sináptica y dendrítica hasta la conectividad de las vías y las estructuras cerebrales (Geschwind y Levitt, 2007; Minshew y Williams, 2007). Estas alteraciones neurobiológicas afectan el desarrollo del comportamiento social y la comunicación durante las etapas tempranas de la niñez (Landa et al., 2007), y parecen estar influenciadas tanto por factores genéticos como ambientales.

## I.6 Factores etiológicos

El DEA es un desorden clínicamente heterogéneo y aproximadamente en el 10% de los pacientes pueden observarse desórdenes genéticos y neurológicos tales como los síndromes de Rett, de Down, de frágil X y Esclerosis Tuberosa, cuya causa es conocida. Sin embargo, en la mayor parte de los pacientes las causas son desconocidas y no se ha podido

identificar un único mecanismo patofisiológico como causa de la enfermedad. La evidencia indicaría que no se ha podido identificar porque no existiría *un único* mecanismo patofisiológico: dependiendo de los procesos que tienen lugar en el momento en el que la homeostasis se altera, dependiendo de cuál/es sean los agentes que ocasionan el desequilibrio, dependiendo de otros factores de riesgo presentes en la persona y en el ambiente y de cuales sean los mecanismos de compensación que se disparen, será el mecanismo patofisiológico que ocasione el DEA (figura I.2).



**Figura I.2. Factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo pre y postnatal.** Estos factores alteran los procesos neurobiológicos y del neurodesarrollo que resultan en las características principales del DEA.

### 1.6.1 Factores genéticos

Existen distintas líneas de evidencia que sugieren que el desorden es heredable a pesar de no existir una causa genética simple. La tasa de concordancia para personas con DEA reportada a partir de poblaciones de gemelos dicigóticos varía entre 0 a 37%, mientras que para gemelos monocigóticos varía entre el 44 al 91% (Steffenburg et al., 1989; Bailey et al., 1995; Constantino y Todd, 2000; Kates et al., 2004). Esto sugiere que la composición genética puede contribuir a un mayor riesgo de desarrollar DEA. Además de la heredabilidad observada en los gemelos, el riesgo de que un hermano no gemelo de una persona con DEA desarrolle también el

desorden resulta 25 veces más grande que el riesgo de la población general (Jorde et al., 1991).

La heredabilidad del DEA sugiere un componente genético, pero no único: serían diversos los genes que podrían ser la causa del desorden. Esos genes varían mucho entre individuos y grupos familiares. Estudios de asociación en todo el genoma, estudios de asociación genética, detección de variación del número de copias y análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) han dejado al descubierto un gran número de genes candidatos asociados al DEA (Abrahams y Geschwind, 2008), incluyendo RELN (Skaar et al., 2005), SHANK3 (Moessner et al., 2007), NLGN3, NLGN4X (Jamain et al., 2003), MET (Campbell et al., 2006), GABRB3 (Buxbaum et al., 2002) y OXTR (Wu et al., 2005). Por otra parte, en varios trastornos originados por mutaciones genéticas simples, incluyendo el síndrome de Rett (MeCP2) (Nagarajan et al., 2008), el de frágil X (FMR1) (Belmonte y Bourgeron, 2006), la esclerosis tuberosa (TSC1 o TSC2) (Wiznitzer, 2004), el síndrome de Timothy (CACNA1C), el síndrome de Cowden (PTEN), y el síndrome de Angelman (UBE3A), la ocurrencia de DEA es mayor que en la población general.

Entre los genes candidatos, varios desempeñan importantes papeles en la función inmune. Proteínas de la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), incluyendo las codificadas por los genes MET, PTEN, TSC1 y TSC2, tienen un papel importante en la regulación de la interleuquina 12, en la producción de las células mieloides y están implicadas en el cambio de fenotipo de macrófagos, del perfil M1 al perfil M2 (Fukao et al., 2002). Los genes candidatos adicionales incluyen haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC-II) (Lu et al., 1991; Torres et al., 2001), el complemento 4B (C4B) (Odell et al., 2005) y el factor inhibidor de macrófagos (MIF) (Grigorenko et al., 2008), y resultan de importancia en las respuestas de dirección y control inmunológico.

Sin embargo, luego de combinar todos los factores de riesgo identificados, incluso con los recientes avances en la identificación de genes,

solo se puede explicar el 10-20% de los casos del total de la población con DEA (Abrahams y Geschwind, 2008). Además, varios de estos factores de riesgo genético pueden también estar presentes en individuos sin DEA, lo que sugiere que muchas de estas mutaciones pueden aumentar el riesgo de desarrollar el desorden, pero se requiere de factores de riesgo adicionales para manifestarlo.

Un estudio reciente, realizado a partir de una muestra grande de una base de datos danesa y usando la clasificación actual para el diagnóstico de DEA, mostró que la tasa de concordancia entre gemelos dicigóticos fue seriamente subestimada en estudios previos, por lo que la influencia de factores genéticos sobre la susceptibilidad de desarrollar autismo estaría sobreestimada (Hallmayer et al., 2011). La hipótesis que guía el trabajo es que, debido a la heredabilidad reportada, se ha enfocado la investigación en la búsqueda de causas genéticas en desmedro de la investigación de potenciales causas o disparadores ambientales. Las potenciales causas ambientales incluirían la edad de los padres (Gardener et al., 2009), el bajo peso al nacer (Schendel y Bhasin, 2008), múltiples nacimientos (Croen et al., 2002) e infecciones maternas durante el embarazo (Atladottir et al., 2010), entre otros. Existe evidencia acumulada que muestra que los primeros síntomas de autismo surgen al final del primer año de vida. Teniendo en cuenta que los gemelos comparten tanto el ambiente prenatal como el postnatal temprano, los autores hipotetizan que al menos algunos de esos factores ambientales están impactando sobre la susceptibilidad de desarrollar autismo, actuando durante el periodo crítico. Cualquiera sea la contribución de estos factores a la tasa de concordancia, estarían siendo malinterpretados y confundidos con causas genéticas en los análisis de gemelos.

Todo esto, sumado a la incompleta penetrancia de los factores de riesgo genéticos, sugiere fuertemente la necesidad de investigar la existencia y la contribución de factores ambientales, a fin de comprender mejor la etiología del desorden.



### *1.6.2 Factores ambientales*

Se han postulado diversos factores no genéticos en la patogénesis del autismo. Estudios epidemiológicos sugieren un aumento en la tasa de esta enfermedad en regiones geográficas particulares (Gillberg, 1983), en nacimientos en determinadas estaciones (Zerbo et al., 2011) y relacionados con factores virales y/o inmunológicos (Singh, 1996; Licinio et al., 2002). También se han propuesto una gran variedad de factores o contaminantes ambientales. A continuación mencionamos algunos de los más estudiados.

La exposición a metilmercurio durante la niñez está asociada a anomalías neurosiquiátricas en el lenguaje, la atención y la memoria (Grandjean et al., 1999; Davidson et al., 2011). DiCicco-Bloom y colaboradores reportaron que la exposición aguda al metilmercurio durante el desarrollo provoca la muerte de células del hipocampo, una reducción en la neurogénesis, y déficits de aprendizaje graves (Falluel-Morel et al., 2007).

Por otra parte, se ha señalado al timerosal, un compuesto orgánico que contiene etilmercurio, como un posible factor etiológico ambiental. Este compuesto ha sido ampliamente utilizado desde la década de 1930 como conservante para prevenir la contaminación microbiana en distintos productos biológicos y drogas, incluyendo muchas vacunas. Ha sido señalado por varios grupos de padres como el responsable de alteraciones en el neurodesarrollo, y, en particular, de aumentar el riesgo de desarrollar autismo (Hviid et al., 2003).

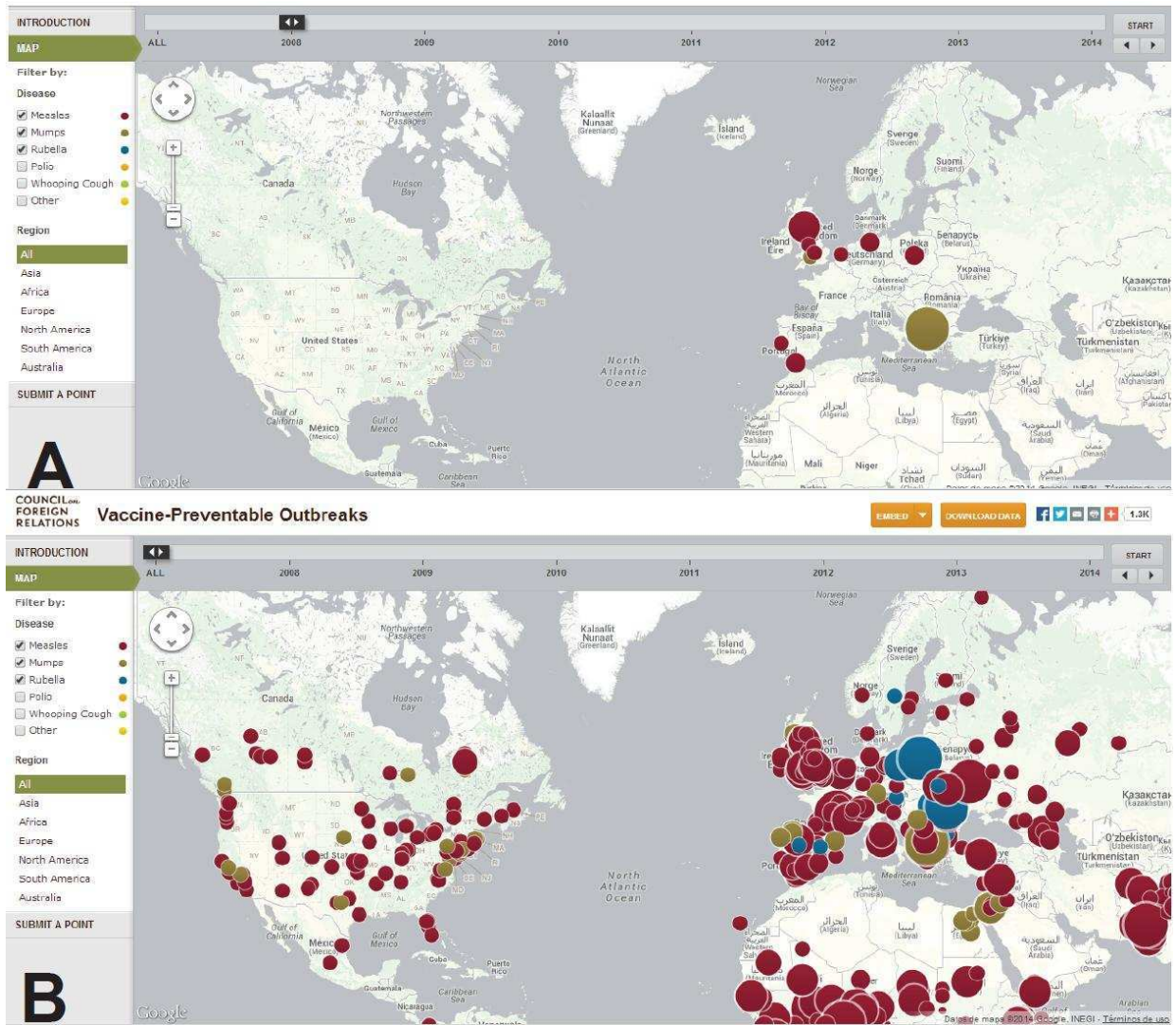
En función de esto, se empezó a considerar a la vacunación como factor de riesgo y se iniciaron numerosas campañas contra la misma. La asociación entre las vacunas que se administran en la niñez temprana (específicamente vacunas de sarampión, paperas y rubeola) y el autismo cobró mucha importancia luego de que, en 1998, se publicara un trabajo en la revista médica *The Lancet*, en el que se establecía una relación causa-efecto entre el mercurio contenido en las vacunas, la colitis y el DEA. El investigador responsable del trabajo fue Andrew Wakefield, quien

posteriormente fue desacreditado por la prensa (Deer, 2011) debido a que tenía múltiples conflictos de intereses no declarados, evidencia manipulada y códigos de ética incumplidos. El trabajo fue retirado de la revista y la revista se retractó parcialmente en el 2004, y totalmente en el 2010 (Paper retirado, 2010). Wakefield fue declarado culpable de fraude por el Consejo Médico General del Reino Unido y su licencia de médico le fue retirada.

El consenso actual de la comunidad científica es que no hay evidencia que relacione a las vacunas con el desarrollo del autismo. Para llegar a esta afirmación se realizaron múltiples estudios epidemiológicos, gastándose una enorme cantidad de recursos. La validez de estos estudios está avalada por las mayores instituciones sanitarias de países como Estados Unidos y el Reino Unido, entre otros: el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), la Academia Americana de Pediatría, la Academia Nacional de Ciencias y el Instituto de Medicina de Estados Unidos, y el Servicio de Salud Nacional del Reino Unido, que corroboraron y revisaron los trabajos realizados.

Lamentablemente la campaña hecha en contra de la vacunación temprana parece haber sido escuchada y hoy se pueden ver brotes de esas enfermedades que no se veían hace 10 años atrás (figura I.3).

Por otra parte, la talidomida, un medicamento contra las náuseas, fue utilizado por mujeres embarazadas entre 1957 y 1962 y causó severos defectos de nacimiento, aumentando además el riesgo de desarrollar autismo. El análisis de los efectos permitió identificar ventanas temporales críticas en el desarrollo: el desorden observado se podía relacionar con el momento en el que la madre había ingerido la droga. Para el caso del autismo esta ventana resultó ser del día 20 al día 23 luego de la fecundación, un estadio temprano del desarrollo neuronal. En ese momento el tubo neural se encuentra cerrándose y las primeras neuronas están naciendo (Stromland et al., 1994).



**Figura I.3. Mapas realizados por el Programa de Salud Global (GHP).** Se muestran los brotes de sarampión (círculos rojos), de paperas (círculos verdes) y de rubeola (círculos azules) en el año 2008 (A) y los acumulados entre el 2008 y el 2014 (B). El GHP es una iniciativa del Consejo de Relaciones Exteriores (<http://www.cfr.org/>).

Otro de los agentes medioambientales más extensivamente estudiados es el ácido valproico (VPA). El VPA es un ácido graso sintetizado por primera vez en 1882 (Burton, 1882) como un análogo del ácido valérico, encontrado normalmente en la valeriana (*Valeriana officinalis*) y usado hasta ese momento como solvente orgánico. Las propiedades antiepilépticas del VPA fueron descubiertas por casualidad, por el investigador Pierre Eymard en 1962, quien estaba investigando la actividad anticonvulsiva de otros compuestos y usaba al VPA como vehículo (Meunier et al., 1963). En la

actualidad se utiliza como medicina anticonvulsiva y estabilizador del humor, principalmente para el tratamiento de la epilepsia y el desorden bipolar.

Se ha establecido una relación entre el VPA y el DEA en varios estudios de caso y en estudios retrospectivos. Esta droga es conocida desde hace tiempo como causante de malformaciones y discapacidades de desarrollo, síntomas de una entidad clínica denominada Síndrome de Valproato Fetal (SVF). Laegreid y su grupo en 1993 realizaron un estudio examinando a 7 niños con SVF: 2 de los 7 casos mostraban síntomas de autismo y 2 más mostraban marcados retrasos de desarrollo (Laegreid et al., 1993). El año siguiente otro trabajo mostró un estudio de caso en el que de 4 hermanos con SVF, 2 habían sido diagnosticados con autismo (Christianson et al., 1994). Otro grupo, en 1997, describió 6 casos más, mostrando que niños con SVF también habían sido diagnosticados con DEA (Williams y Hersh, 1997; Williams et al., 2001). Con el fin de poner a prueba esta asociación, Christensen y su grupo llevaron a cabo un estudio en una población mucho mayor (Christensen et al., 2013). El gran tamaño muestral y todos los controles tenidos en cuenta brindaron evidencia fuerte que relaciona al SVF con el DEA. En el análisis se controlaron potenciales factores de confusión tales como enfermedades psiquiátricas de los padres, edad de los padres al momento de la fecundación, malformaciones congénitas y epilepsias maternas. Del trabajo concluyeron que hay un significativo aumento del riesgo de que los niños expuestos a VPA durante el embarazo desarrollen DEA (Christensen et al., 2013). También sugirieron varios mecanismos por los que el VPA podría estar aumentando el riesgo de DEA, mecanismos que aún deben ser puestos a prueba: una posible interferencia en la función de neurotransmisores, apoptosis neuronal, modificación de la plasticidad, inhibición de deacetilasas de histonas o interrupción del metabolismo del ácido fólico. En línea con esto concluyeron que el estudio de los efectos del VPA sobre el cerebro y sobre el comportamiento podría proveer pistas que indiquen qué caminos recorrer para investigar posibles mecanismos del DEA.

También se han observado ciertos factores maternos y paternos que tienen peso frente a la incidencia de autismo. En un estudio reciente, Kong y sus colaboradores (Kong et al., 2012) encontraron que el esperma de hombres de edad avanzada contenía más mutaciones de ADN en comparación con el esperma de los hombres jóvenes, y estas mutaciones se encontraban comúnmente en sus hijos autistas. Por lo tanto, la edad del padre parece ser un factor de riesgo para los trastornos del espectro autista. También se observó una asociación entre el autismo y la edad de la madre, pero el efecto parece ser mayor en la línea paterna.

Se ha mostrado la asociación entre brotes de enfermedades virales y un aumento en la incidencia de autismo (Hornig y Lipkin, 2001; Patterson, 2008). Un estudio epidemiológico que se realizó a partir de la información del Registro Médico de Dinamarca indicó recientemente que la infección materna es un factor de riesgo para el autismo. El examen fue hecho a partir de 10000 casos de autismo y se encontró una asociación significativa con la infección viral materna durante el primer trimestre (Atladdottir et al., 2010). Retomaremos esta línea de evidencia en la sección siguiente.

## I.7 Neuroinflamación y autismo

Como mencionamos anteriormente, la epidemia de rubeola en 1964 en EE.UU. fue uno de los acontecimientos que cambió el campo desde el cual se estudiaba el DEA. En la actualidad distintos estudios refuerzan esa asociación, siendo uno de los más concluyentes el estudio realizado a partir de la base de datos danesa (Hallmayer et al., 2011). También se ha observado una alta correlación entre la estación en la que ocurre el nacimiento y el riesgo de autismo: la población que nace durante los meses de invierno, momento que coincide con la estación de gripes, muestra un riesgo mayor de desarrollar este desorden (Zerbo et al., 2011).

¿Cuál podría ser la relación entre la exposición a una infección y el autismo? Por un lado, la activación del sistema inmune puede afectar la función normal de la placenta y se han relacionado patologías de la placenta con el autismo (Anderson et al., 2007). Por otro, las infecciones tanto bacterianas como virales y la autoinmunidad pueden resultar en un aumento en la actividad del sistema inmune materno. Distintos estudios usando modelos animales han contribuido a la comprensión de cómo la activación del sistema inmune puede afectar el desarrollo del cerebro fetal (Patterson, 2002). Durante el desarrollo las citoquinas se expresan en niveles muy bajos, jugando un rol en la migración neuronal y glial, en la diferenciación y maduración sináptica (Merrill, 1992). La actividad del sistema inmune materno alteraría no solo los niveles de citoquinas en el suero de la madre, sino también en la placenta y en el cerebro del feto, y este aumento en la concentración de citoquinas en el cerebro podría estar afectando el desarrollo del mismo a distintos niveles, manteniéndose este efecto a largo plazo en la fisiología y el comportamiento.

Los primeros estudios realizados a fin de indagar sobre el efecto de la activación del sistema inmune en el feto sugirieron que las infecciones prenatales virales pueden dañar el sistema inmune, aun inmaduro, e inducir tolerancia vírica (Stubbs y Crawford, 1977), mientras que los estudios posteriores mostraron alteraciones y activación en un subconjunto de células T, en consonancia con la posibilidad de una patogénesis autoinmune (Gupta et al., 1998). Varios estudios de sangre periférica mostraron un amplio rango de anomalías incluyendo disfunción de células B, T y NK, producción de auto-anticuerpos, un aumento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias y una disminución de la producción de inmunoglobulinas (Warren et al., 1986; Singh et al., 1997a; Singh et al., 1997b; Gupta et al., 1998; Jyonouchi et al., 2001; Singh et al., 2002; Vojdani et al., 2002).

Más interesante aun resulta la evidencia de la presencia de glia activada y alteración del perfil de expresión de citoquinas encontradas en el cerebro autista y en el líquido cefalorraquídeo (Vargas et al., 2005; Saetre et al., 2007; Garbett et al., 2008; Morgan et al., 2010). Distintos

laboratorios han llegado de manera independiente a estas conclusiones, a través de una gran variedad de técnicas tales como histología, ELISA, PCR y microarreglos. El hecho de que la desregulación es encontrada tanto en el cerebro de niños como de adultos sugiere un estado permanente de desregulación del sistema inmune a nivel central, que comienza temprano y es mantenido por algún mecanismo de retroalimentación positivo.

La formación anormal de redes neuronales y el desbalance patológico de la neurotransmisión son parte del corazón mismo de los trastornos autistas. ¿Cómo podría esto verse alterado por un desbalance o una alteración en el sistema inmune? Y, por otra parte, ¿qué es lo que inicia este estado inflamatorio subclínico, y cuál es el mecanismo que lo mantiene activado? A fin de poder contestar estas preguntas, se hace necesario un acercamiento a los elementos responsables de la respuesta inmune en el cerebro: las células de la glia y las citoquinas.

### *1.7.1 Células de la glia*

La plasticidad en el cerebro es controlada a 3 niveles diferentes: compartimientos subcelulares, células y redes neuronales. En el circuito neuronal, las conexiones intercelulares están establecidas por sinapsis que operan tanto químicamente (principalmente a través de neuronas) como por medio de uniones gap o eléctricas (principalmente conectando con astrocitos aunque también entre neuronas) (Ransom y Kettenmann, 1990). El origen, el desarrollo y el remodelamiento funcional de redes de alta complejidad celular requieren de un preciso control homeostático ejecutado en los 3 niveles de organización. Este control homeostático es llevado adelante por la glia.

Las células de la glia, inicialmente descritas por Virchow como tejido conectivo que “yace entre las partes nerviosas propiamente dichas, uniéndolas y dándole forma al todo en mayor o menor medida” (Virchow, 1858), están representadas por 2 grupos de tipos celulares, la macroglia,

cuyo origen embrionario es el mismo que el de las neuronas (ectodérmico), y la microglia, que tiene origen mieloide (endodérmico).

Las células de la microglia fueron descritas por Del Río-Hortega (1919-1921) a principios del siglo pasado como "células pequeñas de núcleo chico y conspicuo con al menos dos procesos espinosos". La hipótesis más robusta sobre su origen propone que provienen de monocitos derivados del saco vitelino que ingresan al cerebro durante los primeros estadios del desarrollo (Perry y Teeling, 2013). Estas células se distribuyen a través del parénquima neuronal de manera heterogénea: dependiendo de la región, podemos encontrarlas constituyendo más del 12% de la población de células no neuronales (Lawson et al., 1990; Streit et al., 1999). A medida que el cerebro madura, evolucionan en microglia, adoptando una morfología ramificada.

La microglia ramificada, en estado basal o "de reposo", expresa constitutivamente una variedad de marcadores de superficie: CD11b (Perry et al., 1985), F4/80 (Perry et al., 1985), enzima de unión a calcio Iba1 (Ito et al., 1998) y moléculas de unión a lectinas (Streit et al., 1985; Acarin et al., 1994; Dalmau et al., 2003), que suelen usarse para identificarlas por medio de técnicas inmunohistoquímicas en una variedad de especies, incluyendo ratón, rata y humano (Dalmau et al., 1998; Wirenfeltdt et al., 2003).

En distintas situaciones, la microglia puede "activarse". Una de las características más distinguibles y evidentes de esta activación es la transformación morfológica: en la fase inicial (de minutos a horas luego de un daño) puede observarse la retracción parcial y un ligero engrosamiento de los procesos; en los estadios intermedios los procesos se van haciendo más cortos y gruesos y los somas más grandes y redondos; y finalmente en la fase de máxima activación, las células adoptan una forma ameboidea con un citoplasma vacuolado, indistinguible de un macrófago (figura 1.4-A). Kreutzberg llamó al estado basal, estadio 1; a los estadios intermedios los llamó estadios 2 y 3; y al estado fagocítico, estadio 4 (Kreutzberg, 1996).



En paralelo a la transformación morfológica, aumenta la expresión de marcadores como el CD11b y el F4/80 (Perry et al., 1985), e Iba1 (Ito et al., 1998), y se estimula la expresión de MHC clase I, CD45, CD4 (Streit et al., 1989; Finsen et al., 1991; Finsen et al., 1993a; Lehrmann et al., 1997) e integrinas (Finsen et al., 1993b; Hailer et al., 1997). En el estadio de máxima activación se observa la expresión del marcador ED1, marcador de actividad fagocítica, y se observa secreción de citoquinas y factores tróficos (Block et al., 2007; Ekdahl et al., 2009).

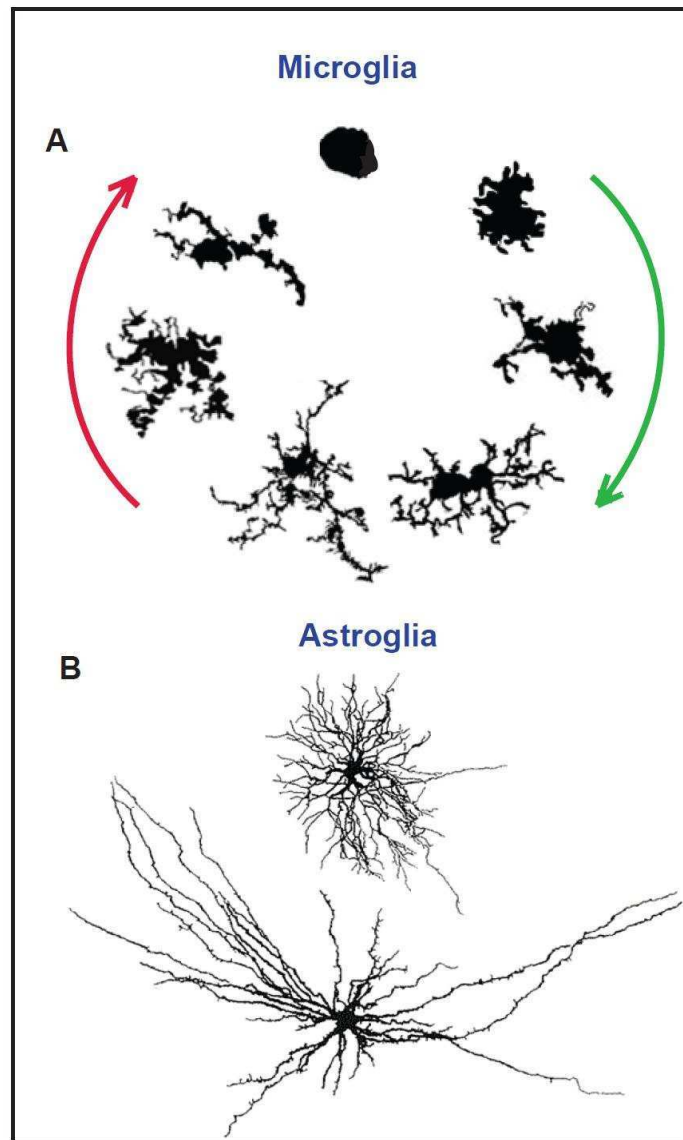
Si bien los marcadores expresados por estas células remiten a los monocitos y macrófagos de la periferia, apoyando la idea de una función central de la microglia en cuanto a la inmunidad en el SNC, este tipo celular está también involucrado en otros procesos de importancia. En estado basal, tiene funciones en el desarrollo neural, la plasticidad sináptica y la cognición, mientras que, en el estado activado, puede inducir tanto comportamientos estereotipados como disfunción cognitiva (Schwarz y Bilbo, 2012; Perry y Teeling, 2013).

En cuanto a la macroglia, esta se clasifica en astroglia, oligodendroglia, y células de Schwann (Nishiyama et al., 2005; Verkhratsky et al., 2010; Verkhratsky et al., 2013). A pesar de que la función común de estos diversos tipos celulares es la de mantener, junto a la microglia, la homeostasis del sistema nervioso central, cada tipo celular cumple con esta tarea por medio de funciones que les son exclusivas. En particular, nos interesa la actividad de la astroglia. El origen de la astroglia es ectodérmico, se diferencia a partir de células neuroepiteliales durante el desarrollo, al igual que las neuronas. La población astrogliar está compuesta por el grupo más heterogéneo de células gliales. Ya en 1909 Santiago Ramón y Cajal había descrito dos tipos morfológicos de astrocitos: los astrocitos fibrosos (con escasos procesos, largos y poco ramificados, asociados mayormente a la sustancia blanca) y los astrocitos protoplasmáticos (con mayor cantidad de procesos y más ramificados, asociados mayormente a la sustancia gris (figura 1.4-B) (García-Marín et al., 2007). Luego se han identificado astrocitos en distintas zonas, con características propias: astroglia radial

localizada en la retina (glia de Müller) y en el cerebelo (glia de Bergmann), astrocitos polarizados en la corteza primaria, ependimocitos, tanicitos, pituicitos, astrocitos perivascuales, etc. (Verkhratsky et al., 2013). Todas estas células expresan constitutivamente la proteína fibrilar glial ácida (GFAP), localizada en los filamentos intermedios, o la proteína de unión a calcio S100B. Ambas proteínas sirven como marcadores que se utilizan para identificar a los distintos tipos de astrocitos mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Las funciones que llevan adelante también son muy variadas, aunque la mayoría están relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis: mantienen el aislamiento del cerebro del resto del cuerpo (regulando la función de la barrera hematoencefálica), controlan la neurogénesis y la correcta migración de las neuronas nuevas (los astrocitos en el nicho neurogénico cumplen el rol de andamiaje), regulan la homeostasis iónica, constituyen el soporte en la generación de sinapsis, mantienen la transmisión sináptica a través de la remoción de neurotransmisores, proveen a las neuronas de glutamato y glutamina (precursor de GABA) y secretan secuestradores de las especies reactivas de oxígeno (Nedergaard et al., 2003; Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Giaume et al., 2007; Wang y Bordey, 2008; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009; Verkhratsky et al., 2013)

Además de controlar la homeostasis, la glia forma un sistema de defensa del cerebro que se activa en respuesta a cualquier tipo de lesión. Ante un estímulo inflamatorio o un evento de neurodegeneración habrá una reacción tanto de la microglia como de la astroglia, y la naturaleza de la reacción dependerá del estímulo y de las condiciones en las que se encuentre el SNC en particular y el individuo en general.



**Figura I.4. Células de la glia.** **A.** Microglia. Los monocitos ingresan en el cerebro en el periodo prenatal, se distribuyen en el parénquima y adoptan una morfología ramificada (flecha verde). Ante un estímulo, y dependiendo de su gravedad, estas células ramificadas se activan (flecha roja), adquiriendo un fenotipo fagocítico. La activación es un proceso reversible (imagen adaptada de (Karperien et al., 2013)). **B.** Astroglia. Se muestran dos tipos de astrocitos: un astrocito protoplasmático (superior) y un astrocito fibroso (inferior) (imagen extraída del Atlas Veterinario de Neurohistología <http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/glia1.html>).

Ya sea por un intento de restaurar la homeostasis o por un estímulo inflamatorio o neurodegenerativo, estos tipos celulares van a responder. La respuesta es un proceso complejo, de múltiples etapas y cuyas características son específicas para los distintos tipos de alteraciones. La microglia activada neuroprotege, elimina patógenos y células muertas o

forma cicatriz, dependiendo de la necesidad. De manera similar, insultos de distintos niveles de severidad y dados por distintas causas inducen diferentes programas de astrogliosis, que se clasifican en isomórficos (procesos reversibles en los cuales la célula mantiene su forma), y anisomórficos (en los que la morfología celular cambia completamente, perdiendo su organización y formando una cicatriz) (Hanisch y Kettenmann, 2007; Ransohoff y Perry, 2009; Kettenmann et al., 2011). Qué tipo celular se activa primero, cuáles son las moléculas que se secretan o se expresan en la superficie, si se reclutan o no células de la periferia, etc. determinará, en gran medida, la progresión y los resultados que tendrá ese estímulo sobre la fisiología y el comportamiento del individuo afectado (Schwarz y Bilbo, 2012; Perry y Teeling, 2013; Verkhratsky et al., 2013).

### *1.7.2 Citoquinas*

Las citoquinas comprenden un grupo de polipéptidos pequeños (8-30 kDa) que poseen una gran potencialidad en cuanto a sus funciones. La mejor descripción de estas moléculas es dada por el término pleiotropía: las citoquinas son responsables de una gran variedad de efectos dependientes de la concentración, del tiempo que se secretan, del entorno, del tejido blanco, de los receptores con los que se encuentran, etc. Actúan a bajas concentraciones (del orden de los pico o nanomoles), pero su concentración puede aumentar rápidamente en respuesta a daños, enfermedades, infecciones, etc., y juegan un rol central en la reparación de tejidos en estados patológicos graves.

A pesar de que durante muchos años se consideró al cerebro como un órgano inmunoprivilegiado, en el cual la respuesta inmune era nula debido a la existencia de barreras físicas que impedían la comunicación entre la periferia y el SNC, hoy se sabe que los estímulos inflamatorios periféricos pueden inducir cambios en los niveles de citoquinas en el cerebro (Pitossi et al., 1997). Estos cambios pueden deberse al pasaje de citoquinas que llegan desde la periferia a ciertas regiones del cerebro en las cuales la barrera

hematoencefálica es permeable, como en los órganos circunventriculares (Konsman et al., 2002), o a un transporte activo de algunas citoquinas a través de esta barrera (Plotkin et al., 1996; Plotkin et al., 2000). Por otra parte, las citoquinas que circulan en la periferia pueden inducir la expresión de citoquinas en células endoteliales, las cuales pueden ser liberadas al parénquima cerebral (Kerschensteiner et al., 2009). Otra forma en que el aumento de citoquinas periféricas puede afectar el sistema inmune del cerebro es a través de la estimulación del nervio vago (Licinio y Wong, 1997; Johnston y Webster, 2009). A su vez, las células de la glia, células endoteliales, neuronas, linfocitos y macrófagos infiltrados de la periferia también pueden secretarlas dentro del parénquima cerebral (Hopkins y Rothwell, 1995; Whitney et al., 2009).

Inicialmente se pensó que su función en el cerebro estaba limitada a mediar en las respuestas inmunológicas e inflamatorias, entre las cuales encontramos la respuesta inflamatoria aguda, la migración de leucocitos a los tejidos, y la regulación del proceso de reparación de tejidos. Sin embargo, en los últimos años han sido asociadas además a otros procesos fisiológicos como la supervivencia celular, la diferenciación neuronal (Mathieu et al., 2010), comportamientos de aprendizaje (Depino et al., 2004), comportamientos asociados a la enfermedad (*sickness behavior*; interesante revisión en (Dantzer, 2001)) y procesos de mielinización (Schmitz y Chew, 2008), entre otros.

### *1.7.3 Glia y citoquinas en el autismo*

El trabajo que ya mencionamos del doctor Pardo y su grupo (Vargas et al., 2005), inició en el campo una serie de estudios sobre el comportamiento de la glia en pacientes con DEA. Basándose en análisis neuropatológicos de tejido cerebral *post-mortem* de 11 pacientes (de 5 a 44 años), demostraron la presencia de una persistente y activa neuroinflamación en la corteza, en la sustancia blanca y, notablemente, en el cerebelo. Inmunohistoquímicas de estos tejidos mostraron una marcada

activación tanto de la astrogliosis como de la microglia con respecto a un grupo control. La activación de la glia fue particularmente prominente en el cerebelo.

Analizaron la astrogliosis por medio de una inmunohistoquímica contra la proteína fibrilar acida (GFAP) en el giro medio frontal, en el giro cingulado anterior y en el cerebelo y observaron una reacción de la astrogliosis, manifestada en el volumen tanto del soma como de los procesos celulares. En el cerebelo hallaron una marcada reactividad de la glia de Bergman en áreas en las que se observaba pérdida neuronal en la capa de células de Purkinje. También observaron reactividad en la capa granular y en la sustancia blanca.

El patrón de activación de la microglia fue caracterizado por medio de una inmunohistoquímica contra marcadores de MHC-clase II, marcadores que se expresan solo en la microglia activada. Observaron la microglia activada en distintas zonas, pero la más significativa activación fue observada en el cerebelo.

Si bien resulta aún poco claro el rol de la activación de la glia en el autismo, cómo esta respuesta está involucrada en los mecanismos patogénicos y en qué momento aparece, resulta inequívoca la necesidad de estudiar su contribución al desorden.

En cuanto a la relación entre las citoquinas y el autismo, existen reportes de perfiles de expresión alterados tanto en la periferia como en el SNC de pacientes. Se ha encontrado en individuos con DEA que sus células mononucleares sanguíneas secretan mayores niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-1 $\beta$  que los controles (Jyonouchi et al., 2001; Malik et al., 2011), aunque también secretan mayores niveles de IL-1ra, sTNFR1, y sTNFR2, moléculas que limitan la respuesta inflamatoria. También se vio que luego de una estimulación con lipopolisacáridos (LPS) u otros ligandos de receptores Toll, los monocitos de pacientes con DEA muestran una respuesta inmune distinta a los controles, con una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias (Jyonouchi et al., 2001; Enstrom et al., 2010). Además

hay reportes de pacientes que muestran elevados niveles IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra y sTNFRII en sangre (Croonenberghs et al., 2002; Zimmerman et al., 2005; Suzuki et al., 2011). Así, numerosas evidencias sugieren que las alteraciones inmunes en el DEA son complejas, constituyendo un estado pro-inflamatorio y presentando una respuesta inmune alterada.

Hemos mencionado que factores genéticos, ambientales, y otros factores desconocidos están contribuyendo a una disfunción del sistema inmune. La disfunción inmune constituiría así un posible punto de convergencia que, para nosotros, constituye el denominador común de las alteraciones observadas en el comportamiento. La gran heterogeneidad que caracteriza al desorden podría deberse, al menos en parte, a los distintos factores etiológicos, pero la neuroinflamación crónica y las consecuencias que ésta tiene sobre el funcionamiento del cerebro sería lo que subyace a las características principales del desorden.

Mientras que una solución a este desorden tan heterogéneo puede no existir, la evidencia sugiere que la manipulación de la respuesta inmune podría, al menos, mejorar los síntomas principales que caracterizan el desorden.

## 1.8 Modelos animales de autismo

Para poder identificar los factores que contribuyen a la etiología de un desorden del desarrollo como el autismo es necesario comprender los mecanismos cerebrales básicos que lo regulan. Dado que los estudios poblacionales sugieren que esta enfermedad es consecuencia tanto de factores genéticos como ambientales, necesitamos poder manipular éstos para determinar los efectos a corto y largo plazo que poseen en el desarrollo del cerebro. Para ello es imprescindible la generación de modelos animales.

Según McKinney (McKinney, 1984), un modelo animal es un preparado desarrollado en una especie con el propósito de estudiar fenómenos que ocurren en otra. En el caso de las patologías neuropsiquiátricas humanas la utilidad se encuentra restringida por las diferencias entre los sistemas nerviosos de los humanos y del resto de los animales, y también por la necesidad de determinar cuáles comportamientos son análogos entre ambas especies. En general, los modelos empleados representan un recorte de los síntomas de la patología y esto no debe ser olvidado, ya que condiciona cuánto de lo observado en el modelo puede ser extrapolado.

Un buen modelo debe ser reproducible y debe cumplir con ciertas características para ser considerado válido (McKinney, 1984; Treit, 1985; Willner et al., 1992): debe poder recapitular los síntomas de la enfermedad que pretende modelar, es decir que debe contar con *validez aparente*; debe poder predecir los efectos que un tratamiento tendrá en los humanos afectados por la patología, esto implica tener *validez predictiva*; y, por último, debe existir una similitud entre las bases biológicas subyacentes del modelo animal y la enfermedad humana, esto es, poseer *validez de constructo*.

En particular para los modelos de autismo, en los últimos años se han desarrollado una batería de ensayos comportamentales que permiten estudiar la respuesta social, la comunicación, el interés restringido y el comportamiento repetitivo o estereotipado en ratones. Con esta batería pueden evaluarse las características principales que se buscarán modelar, además del efecto de potenciales terapias o tratamientos (Crawley, 2007; Moy et al., 2007).

### *1.8.1 Modelos genéticos*

Existen numerosos modelos animales basados en la manipulación de genes candidatos para el desarrollo del autismo. Algunas líneas mutantes se basan en mutaciones monogénicas que subyacen a síndromes que presentan comportamientos asociados con el autismo, mientras que otras



se basan en *loci* que confieren susceptibilidad a la enfermedad, identificados mediante estudios poblacionales.

En el caso de líneas mutantes monogénicas, al menos 6 genes vinculados al cromosoma X han sido relacionados con el autismo. Estos genes son el gen de retraso mental de frágil X (Fmr1) (Belmonte y Bourgeron, 2006), el gen de la proteína de unión a CpG metilados 2 (MECP2) (Nagarajan et al., 2008), los genes de la neuroliquina (NLGN) 3 y de la NLGN 4 (Jamain et al., 2003), y los genes de esclerosis tuberosa 1 y 2 (TSC1 y TSC2) (Young et al., 2010; Tsai et al., 2012). A modo de ejemplo: en el modelo de síndrome de Rett, el ratón nulo para el gen de MECP2 muestra un desarrollo normal durante aproximadamente el primer mes de vida, seguido de alteraciones neurológicas cada vez más graves y posteriormente la muerte alrededor de la semana 10 de vida (Shahbazian et al., 2002; Moy y Nadler, 2008). El fenotipo conductual del mutante incluye hipoactividad, convulsiones, y movimientos estereotipados de las extremidades anteriores, temblor corporal, ataxia de la marcha, y unión de las extremidades cuando es levantado (*claspings*), lo que recuerda a los movimientos de pinza realizados con los dedos que se observan en algunos niños con DEA. Además, ratones nulos para la proteína específicamente en las neuronas GABAérgicas muestran un comportamiento relacionado con el autismo, lo que sugiere que esas neuronas son un objetivo importante para las anomalías del comportamiento observadas (Chao et al., 2010). Además de estas alteraciones en la conducta, recientemente Yang y colaboradores (Yang et al., 2012) informaron que las células T-helper tanto de niños como de ratones con una duplicación del gen MECP2, muestran una reducción similar en la secreción de IFN- $\gamma$ . Esta reducción podría conducir a un estado parcial de inmunodeficiencia, lo cual le asignaría al sistema inmune un rol importante en el autismo.

Otra opción en lugar de usar mutantes monogénicos es usar cepas cuyo comportamiento se encuentra relacionado con el autismo: por ejemplo, la cepa endocriada de ratones BTBRT+tf/J (BTBR). Esta cepa muestra impedimentos en la interacción social y comportamientos

repetitivos análogos a los observados en autismo. También muestra un déficit en la tarea de aprendizaje reverso en un laberinto de agua, lo que puede interpretarse como una resistencia al cambio de rutina que es normalmente observado en personas con DEA (Bolivar et al., 2007; Yang et al., 2007; McFarlane et al., 2008; Moy et al., 2008). Por último, las crías BTBR separadas de sus madres emiten más vocalizaciones ultrasónicas (en cantidad y en intensidad), pero menos diversas en comparación con las crías de C57 (Scattoni et al., 2008) y menos vocalizaciones en la adultez (Wohr et al., 2011). El inconveniente de este modelo es que las comparaciones deben realizarse con otra cepa totalmente distinta, por lo general la cepa C57BL/6J, por lo que las diferencias genéticas son múltiples y desconocidas.

En resumen, los modelos animales genéticos proveen evidencia que apoya la participación de distintos mecanismos o estructuras en el desarrollo de las alteraciones observadas en el autismo. A pesar de tener una validez de constructo limitada, ya que las mutaciones mencionadas sólo se han observado en pequeños grupos de pacientes, la variedad de herramientas genéticas disponibles permiten llevar adelante una evaluación controlada de la contribución de distintas vías celulares o moleculares en la neurobiología del autismo, para evaluar luego su potencialidad como blanco de tratamientos o prevención.

### *1.8.2 Modelos ambientales*

#### 1.8.2.1 Modelo de activación inmune materna

Diferentes diseños experimentales han sido utilizados para estudiar los efectos de la activación inmune materna (AIM) sobre el desarrollo del cerebro del feto: exposición al virus de influenza humana (Fatemi et al., 1999; Fatemi et al., 2002; Shi et al., 2003; Fatemi et al., 2008; Shi et al., 2009), simulación de una infección bacteriana usando LPS (Golan et al., 2005; Ashdown et al., 2006; Graciarena et al., 2010), o simulación de una infección viral usando un ARN sintético de doble cadena, ácido poli-

inosínico-poli-citidílico (polil:C) (Meyer et al., 2006; Smith et al., 2007; Shi et al., 2009). Estos estímulos llevan a la alteración de los niveles de citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF- $\beta$ 1 en la placenta y en el líquido amniótico, pero también resultan en la alteración de los niveles de estas citoquinas en el cerebro fetal y neonatal (Golan et al., 2005; Ashdown et al., 2006; Meyer et al., 2006; Graciarena et al., 2010).

De todos ellos, dependiendo del momento, de la naturaleza del estímulo, del modo de administración, etc, el modelo resultará en un modelo de autismo, de esquizofrenia, de ansiedad, de depresión, etc. Los siguientes son algunos ejemplos de modelos de AIM de autismo.

Uno de los modelos más usados de AIM parte del hecho de que la gripe o influenza en una mujer embarazada es considerada un factor de riesgo para el niño. El modelo consiste en exponer al animal prenatalmente a este factor de riesgo. Existen distintos diseños experimentales para conseguir ese objetivo, uno de ellos consiste en anestesiar a ratonas preñadas a la mitad de su preñez, forzando la inhalación del virus de influenza humano. Al evaluar a las crías, se observaron anomalías histológicas en el hipocampo y la corteza de las crías (Fatemi et al., 1999; Fatemi et al., 2000) y alteraciones de la expresión del marcador presináptico SNAP-25, de la óxido nítrico sintasa neuronal y de reelina. También se vio que las células piramidales estaban empaquetadas más densamente (Fatemi et al., 2002) y tanto en animales jóvenes como en adultos se vio una disminución de las células de Purkinje (Shi et al., 2009). Sumado a estas alteraciones, este modelo mostró una serie de diferencias en el comportamiento, incluyendo déficit en la interacción social, en el campo abierto y en el ensayo de reconocimiento de objeto nuevo (Shi et al., 2003).

Otro modelo de AIM es el que imita la infección causada por bacterias usando lipopolisacárido (LPS) como estímulo. Este modelo se ha llevado adelante tanto en ratones y ratas como en conejos, por medio de la inyección (intrauterina, i.p. o i.v.) de LPS, que actúa activando el receptor

tipo Toll 4. Algunas de las alteraciones observadas son una disminución en la interacción social y en el aprendizaje y un aumento en el comportamiento relacionado con la ansiedad [revisado en (Jonakait, 2007; Meyer et al., 2007; Patterson, 2008; Smith, 2008)]. También se observó neuroinflamación, evidenciada tanto por astrogliosis como por activación de la microglia [revisado por (Jonakait, 2007; Patterson, 2008)] en animales jóvenes. Esta neuroinflamación se mantuvo hasta la adultez cuando el protocolo usado fue un protocolo severo de exposición a LPS (Borrell et al., 2002).

Un tercer modelo de AIM es el que simula la activación por un virus, inyectando a la hembra preñada con polil:C, estímulo que actúa a través del receptor tipo Toll 3. La inyección en ratas o ratones genera alteraciones comportamentales e histológicas similares a las vistas en las crías de madres infectadas con el virus de influenza (Shi et al., 2003; Smith et al., 2007; Shi et al., 2009). Este modelo ha sido ampliamente utilizado y muchos resultados han sido reproducidos por distintos grupos, incluyendo déficit en la interacción social, en la memoria de trabajo y en la exploración de un objeto nuevo, y un aumento en el tiempo de un aprendizaje contrario a algo ya aprendido (Shi et al., 2003; Zuckerman et al., 2003; Meyer et al., 2005; Meyer et al., 2006; Ozawa et al., 2006; Smith et al., 2007; Smith, 2008; Wolff y Bilkey, 2008).

No solo encontramos diferencias en el tipo de estímulo que se utiliza, sino también en el momento en el que el feto es expuesto al estímulo inflamatorio. En una serie de experimentos realizados por el grupo de Meyer, administrando polil:C el día gestacional (DG) 9 (correspondiente con la mitad del embarazo humano) o el DG17 (correspondiente con una fase tardía del embarazo), se observaron diferencias en los déficits comportamentales, en la neuropatología y en la respuesta de citoquinas dependiendo del momento de exposición (Meyer et al., 2006). Ratones adultos expuestos a la AIM el DG9 mostraron una disminución en el comportamiento de exploración, mientras que aquellos expuestos el DG17 mostraron un comportamiento perseverante. Al evaluar el día postnatal

(DP) 24, pudieron ver una marcada reducción de inmunoreactividad para la proteína reelina en el hipocampo en los animales expuestos a la AIM el DG9 con respecto a sus controles, no así en los expuestos el DG17. Por otra parte, los animales expuestos a la AIM el DG17 mostraban en el giro dentado dorsal del hipocampo un aumento en la apoptosis, visualizada como inmunoreactividad positiva para la caspasa 3, una enzima clave en el proceso de apoptosis, a diferencia de los expuestos el DG9, que no mostraban diferencia con sus respectivos controles. Finalmente, Meyer encontró que solo el estímulo inflamatorio tardío fue capaz de ocasionar un aumento en los niveles de IL-10 y TNF- $\alpha$  en el cerebro fetal (Meyer et al., 2006).

Con toda esta evidencia podemos decir que la AIM es un buen modelo de autismo, no sólo porque modela los síntomas del desorden, sino también porque modela la heterogeneidad observada entre las personas con DEA dependiendo del momento del desarrollo en el que es experimentada la respuesta inflamatoria.

#### 1.8.2.2 Modelo de ácido propiónico

A menudo co-existen alteraciones gastrointestinales con el autismo, pero estas no han sido debidamente estudiadas (de Theije et al., 2011). Algunos padres reportan una asociación entre severos dolores abdominales y el inicio o la gravedad de los síntomas (Jyonouchi et al., 2002), la cual podría ser consecuencia de reacciones autoinmunes o alergias (Jyonouchi, 2009) o bien de alteraciones en la flora gastrointestinal (Finegold et al., 2002). En base a estas evidencias se ha desarrollado un modelo animal en ratón para examinar metabolitos bacterianos entéricos como posibles desencadenantes ambientales del DEA.

El ácido propionico (PPA) y otros ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo el ácido butírico y el ácido acético) se producen en el cuerpo durante el metabolismo celular normal y después de la fermentación bacteriana entérica de carbohidratos y proteínas de la dieta (Mortensen y Clausen, 1996). Las bacterias que lo sintetizan son bacterias entéricas como

*Desulfovibrio vulgaris* o Bacteriodetes, las cuales han sido aisladas de pacientes con DEA (Finegold et al., 2002; Finegold et al., 2010). Bajo circunstancias normales, estos ácidos grasos de cadena corta son metabolizados principalmente en el hígado. Sin embargo, si hay alteraciones genéticas en el metabolismo (Wajner et al., 2004; MacFabe et al., 2007), se pueden encontrar niveles de estos ácidos grasos mayores a los normales en la sangre circulante, que pueden atravesar la barrera intestinal y la barrera hematoencefálica pasiva y/o activamente por medio de transportadores de alta afinidad (MacFabe et al., 2007). En estas condiciones, los ácidos grasos de cadena corta pueden concentrarse de forma intracelular, especialmente en condiciones de acidosis (Karuri et al., 1993; Rorig et al., 1996), pudiendo tener efectos perjudiciales sobre el desarrollo y la función del cerebro (Mortensen y Clausen, 1996; Maurer et al., 2004; Shah et al., 2006). El aumento de PPA podría ser importante en el contexto del DEA, dado que se sabe que este metabolito afecta la señalización celular (Nakao et al., 1998), la síntesis y secreción de neurotransmisores (DeCastro et al., 2005), la función mitocondrial (Wajner et al., 2004), el metabolismo de los lípidos (Hara et al., 1999), la función inmunológica (Shah et al., 2006) y la expresión de genes (Parab et al., 2007), todos procesos que han sido implicados en el desorden (MacFabe et al., 2007; Parab et al., 2007; Tamiji y Crawford, 2010).

Debido a todo esto es que distintos grupos están trabajando con el modelo de PPA y han puesto a prueba los efectos del aumento de los niveles de PPA en la en el SNC sobre el comportamiento y los síntomas del DEA en roedores. Una inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de PPA en ratas adultas induce neuroinflamación, movimientos motores repetitivos y anormales, comportamiento social alterado y convulsiones (MacFabe et al., 2007; Shultz et al., 2008; Shultz et al., 2009). Cuando el PPA se inyecta en ratas jóvenes, la neuroinflamación se observa en el hipocampo y los animales muestran un comportamiento social reducido y dificultad para revertir una asociación aprendida previamente (MacFabe et al., 2011). Estas evidencias apoyan la validez aparente de este modelo en ratas

adultas. Sin embargo, aún no se ha estudiado si estos efectos son específicos para el tratamiento de PPA o también pueden ser observados con otros inflamógenos aplicados del mismo modo (i.c.v.).

#### I.8.2.3 Modelo de exposición a VPA

Como se mencionó antes, el ácido valproico es uno de los factores ambientales más directamente asociado al DEA, ya que la exposición prenatal al mismo puede causar un síndrome de características similares al DEA.

Debido a que el ácido valproico es una droga antiepiléptica muy usada (Dufour-Rainfray et al., 2011), el mecanismo de acción más estudiado es el aumento que genera en la concentración del ácido gamma amino butírico (GABA), el mayor neurotransmisor inhibitorio (Dufour-Rainfray et al., 2011); pero también se conoce su acción como modulador de canales de sodio voltaje dependientes y de la señalización glutamatérgica (Monti et al., 2009). Sin embargo, se ha mostrado en un modelo de convulsiones que el tratamiento de VPA no afecta ni la intensidad ni la frecuencia de las convulsiones los primeros días, aunque sí protege de los impedimentos cognitivos inducidos por las convulsiones (Jessberger et al., 2007). Los autores concluyen que estos resultados pueden explicarse, al menos en parte, por la inhibición de deacetilasas de histonas (HDAC) (Jessberger et al., 2007). De hecho, varios estudios recientemente publicados apoyan la idea de que el VPA podría estar bloqueando la actividad de las HDAC en las neuronas (Akhtar et al., 2009; Fukuchi et al., 2009).

El modelo de exposición a VPA fue propuesto por Rodier en 1996 y es uno de los más frecuentes modelos usados con causa ambiental (Rodier et al., 1996; Rodier et al., 1997; Roullet et al., 2013). Hasta el momento, varios laboratorios independientes han mostrado que la exposición prenatal temprana al VPA lleva a anormalidades comportamentales similares a las características principales de los autistas: una disminución en la interacción social, hiposensibilidad al dolor, memoria de miedo más intensa y más duradera, y cambios en el tipo de vocalizaciones ultrasónicas (Vorhees,

1987; Wagner et al., 2006; Dufour-Rainfray et al., 2011; Lin et al., 2013). Además de estos déficits relacionados con los síntomas principales, otros comportamientos han sido investigados. Estos comportamientos están relacionados con aquellos síntomas co-existentes o asociados a la presencia de DEA: un aumento en el comportamiento relacionado con la depresión (Nakasato et al., 2008), un aumento en el comportamiento relacionado con la ansiedad (Mehta et al., 2011) y una desregulación del ritmo circadiano (Tsuji no et al., 2007) han sido reportados en el modelo de VPA en roedores.

A nivel celular se ha visto que el VPA puede influenciar la morfología neuronal y la formación de circuitos. Por ejemplo, la exposición a VPA el DG 12.5 aumenta el nivel de complejidad de la arborización dendrítica en las células piramidales de la corteza motora en el cerebro de las crías (Snow et al., 2008). Registros múltiples simultáneos de célula entera de la capa 5 de la corteza somatosensorial (Rinaldi et al., 2008a; Rinaldi et al., 2008b) y de la corteza prefrontal media (Rinaldi et al., 2008a; Rinaldi et al., 2008b) realizados en secciones de cerebro de ratas expuestas a VPA mostraron un aumento en la conectividad local específicamente con células vecinas que se encuentran a menos de 50  $\mu\text{m}$  con respecto a sus controles. En ambos casos el aumento en el número de conexiones va de la mano de una disminución en la fuerza de estas conexiones. También se ha visto recientemente una disminución en la densidad de espinas en estructuras del cerebro anterior y un aumento en el largo de las dendritas (Bringas et al., 2013). Estos hallazgos podrían explicar tanto la hipo-conectividad distal como la hiper-conectividad local. Además, se ha visto que el VPA promueve el crecimiento de neuritas y la proliferación neural (Hao et al., 2004), eventos que podrían favorecer el temprano y exagerado crecimiento del cerebro (Chomiak y Hu, 2013).

A nivel molecular, en este modelo en ratón se han visto alteraciones en la expresión de algunos genes relacionados al autismo. Por ejemplo, se observaron menores niveles de expresión de BDNF en la corteza somatosensorial de ratones expuestos a VPA (Roullet et al., 2010) y menores niveles de expresión de neuroligina 3 (NLGN3) en la corteza



somatosensorial y en el hipocampo (Kolozi et al., 2009). La identificación de los genes blanco regulados por la exposición a VPA durante el desarrollo podría ayudar a entender mejor la neurobiología que subyace al desarrollo de comportamientos relacionados con el autismo. El análisis de la expresión génica de embriones de la cepa de raton CD1 tratados con VPA o análogos no teratogénicos (valpromida o valnoctamida) reveló un grupo de 11 genes que aumentan su expresión y de 20 genes que disminuyen su expresión debido al tratamiento de VPA (Okada et al., 2005). De los genes cuya expresión se vio alterada y cuya función se conoce, muchos de ellos están relacionados con el ciclo celular y las vías de apoptosis. Se requiere mucha más investigación aun para poder identificar claramente a los genes blancos y poner en evidencia cual es su influencia sobre el neurodesarrollo.

Con respecto a la síntesis de neurotransmisores, se vio en pacientes con autismo que la unión de serotonina a sus receptores está disminuida mientras que la unión al transportador de dopamina se encuentra aumentada (Nakamura et al., 2010). Una desregulación monoaminérgica también se ha observado en el modelo de VPA: los niveles basales de dopamina se encuentran aumentados en ratas expuestas a VPA (Nakasato et al., 2008) mientras que los niveles de serotonina están disminuidos (Dufour-Rainfray et al., 2011).

Todo esto hace del modelo de VPA un modelo idóneo para estudiar tanto el fenotipo comportamental, la patofisiología, la relación entre comportamiento y alteraciones observadas, y la evolución temporal del desorden, como también abre la puerta para evaluar el efecto de distintas terapias y tratamientos.

## Hipótesis y objetivos

---

En base a los antecedentes, y teniendo en cuenta los conocimientos que se tienen acerca del autismo, proponemos la **hipótesis** de que procesos inflamatorios centrales subyacen el desarrollo de los síntomas del autismo. Postulamos que la inflamación (en particular la activación glial) podría estar modulando los procesos de mielinización, neurogénesis y/o sinaptogénesis, produciendo alteraciones en el desarrollo neural que resultarían en los síntomas conductuales.

Nos propusimos estudiar la activación de la glia en un modelo ambiental de autismo y la respuesta ante un estímulo inflamatorio periférico. El **objetivo general** de esta tesis es el de dilucidar el rol que juega la respuesta inflamatoria/glial del sistema nervioso central en la aparición de comportamientos relacionados con el autismo. De esta manera esperamos contribuir al conocimiento acerca de las causas y mecanismos de la enfermedad, aportando así al desarrollo de un tratamiento.

Los **objetivos específicos** de esta tesis son:

1. Caracterizar el comportamiento del modelo de VPA en ratones F1 (C57BL/6JxBalb/c), evaluando particularmente comportamientos relacionados con el autismo, la ansiedad y la depresión.
2. Estudiar la co-ocurrencia en el modelo de alteraciones basales en el sistema inmune innato y en la respuesta inflamatoria, tanto a nivel periférico como central.
3. Estudiar las posibles relaciones entre el fenotipo comportamental, la presencia de neuroinflamación y la respuesta exacerbada del eje HPA.

# Capítulo II-Materiales y Métodos

---

## II.1 Animales

Los animales usados para los capítulos III y IV de esta tesis fueron ratones de las cepas BALB/c AnNCr1 (BALB/c) y de la cepa C57BL/6J (C57) criados por varias generaciones en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir. Los núcleos de origen fueron comprados en Charles River Laboratory (Willmington, Mass. EEUU) y en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EEUU) respectivamente. Los animales usados para el capítulo V fueron ratones de la sub-cepa exocriada CrIFcen:CF1 (CF1), criados en el Bioterio Central de la Universidad de Buenos Aires.

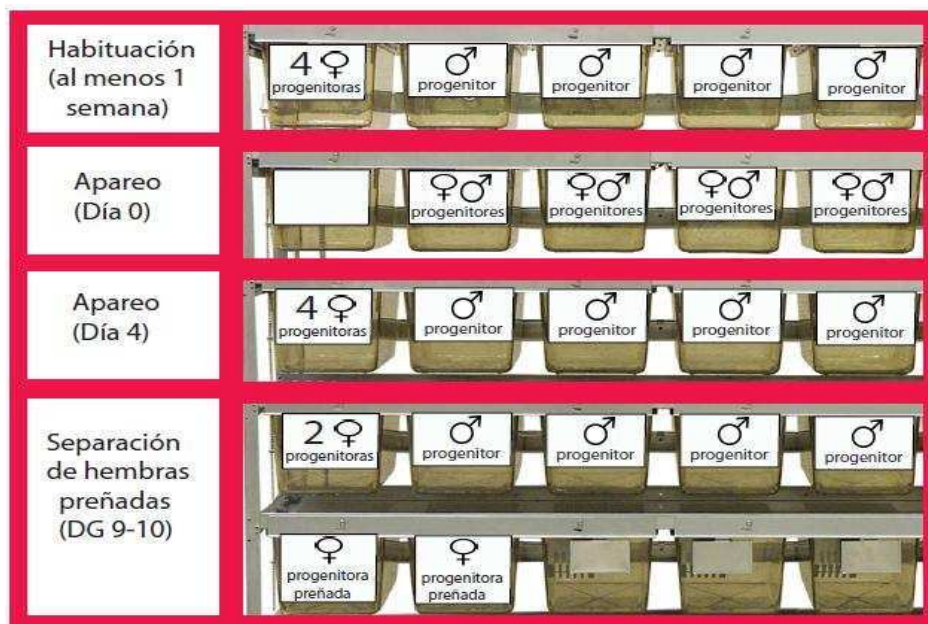
Todos los animales fueron expuestos a un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 hs, prendiéndose la luz a las 08:00. Fueron mantenidos a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y tuvieron a su disposición comida y bebida *ad libitum*.

### II.1.1 Tratamiento de progenitores

Se recibieron animales de 8-12 semanas de edad: hembras BALB/c y machos C57BL/6J. Se planificaron apareos de modo de obtener una filial 1 (F1). Las razones para realizar estos apareos mixtos fueron: evitar que las madres fueran de la cepa C57BL/6J ya que éstas tienden a desatender sus camadas cuando son primerizas, tener crías que presentan un comportamiento activo, permitiendo detectar alteraciones en el mismo (a diferencia de la cepa BALB/c que es poco activa), y a que en nuestra experiencia se obtienen un mayor número de hembras preñadas. Además, la literatura ha muchas veces recalcado el vigor híbrido de estas F1, que muestran fenotipos y respuestas menos variables que las de las cepas puras. Las crías de la F1 así generada son genéticamente uniformes. Además, se utilizaron solo hembras vírgenes, de modo de homogeneizar la variabilidad en el cuidado materno entre camadas.

Se distribuyeron a los machos progenitores en jaulas individuales mientras que las hembras fueron distribuidas de a 4-5 por jaula. Los animales distribuidos de esta manera permanecieron al menos una semana en la sala a modo de habituación. Al término de ese tiempo, se comenzó

con una tanda de apareos, reuniendo a una hembra progenitora con un macho en la jaula del macho, considerándose ese día el día 0 de apareo. Las hembras permanecieron en esa jaula hasta el cuarto día o bien hasta observar la presencia de tapón vaginal. La observación de presencia/ausencia de tapón se realizó diariamente antes de las 10 de la mañana. Debido a que los ratones desarrollan la mayoría de sus actividades durante la noche, la presencia por la mañana de tapón vaginal evidencia un coito ocurrido con alta probabilidad durante la noche, por lo que el día en que el tapón vaginal fue detectado fue considerado el día gestacional (DG) 0.5. Al retirar a la hembra de la jaula del macho, la misma fue devuelta a su jaula original (ver esquema de apareo en figura II.1). Cuando la preñez fue evidente (DG9 o 10), la hembra fue separada en una jaula individual.



**Figura II.1. Ejemplo de tanda de apareo.** Las hembras progenitoras se mantienen juntas hasta ser reunidas con un progenitor. El día que se reúnen es el día 0 de apareo. Se chequea la presencia de tapón vaginal diariamente antes de las 10 de la mañana y se devuelven a su jaula cuando se observa tapón. En ausencia de tapón se separan el día 4. En el caso de las progenitoras que resultan preñadas, la preñez se hace evidente a 9-10 días desde el momento de observar tapón vaginal, en ese momento se las separa en una jaula individual. En el ejemplo de la figura, 2 de las progenitoras resultaron preñadas, razón por lo que se las separó. Las restantes hembras no preñadas serán usadas para subsiguientes apareos.

Al DG 12.5 se le asignó a cada ratona preñada uno de los tratamientos (ver sección II.2.1) de manera aleatoria. A partir del día 18 las jaulas

fueron observadas por la mañana y hasta las 15 hs, y el primer día que se observó la camada se consideró el día postnatal (DP) 0. Esta asignación resulta en cierto modo arbitraria, ya que los partos pueden darse en cualquier momento del día, y lleva a considerar de la misma edad a camadas que pueden tener hasta 18 horas de diferencia, aunque se ha reportado que los partos se producen con mayor frecuencia entre 4 a 8 horas luego de apagarse la luz (Silver, 1995). Esto implica una fuente de variabilidad en los datos de las crías a tener en cuenta.

La camada permaneció con la madre hasta el DP21, momento en el que fue destetada. La hembra progenitora fue sacrificada luego del destete, mientras que los machos progenitores fueron utilizados en distintas tandas de apareo, con una semana de descanso como mínimo entre tandas y sólo hasta los 6-8 meses de edad, momento en el que fueron sacrificados.

### *II.1.2 Crías F1*

#### II.1.2.1 Tratamiento de las crías

Se regularon las camadas de forma tal que cada madre crió entre 4 y 8 individuos. Al DP3 cada cría fue identificada con una marca en alguna de las patas. Cuando fue necesario pesar, observar o evaluar el comportamiento de la camada, la madre fue retirada de la jaula y colocada en una jaula nueva y luego de la evaluación fue devuelta a la jaula con sus crías. En todos los casos la separación no duró más de 15 minutos. Durante ese tiempo se colocó la jaula con las crías sobre una almohadilla térmica, a fin de mantener la temperatura corporal de las mismas. Los animales fueron destetados el DP21. Solo trabajamos con machos debido a la prevalencia de autismo 4:1 en hombres con respecto a mujeres. Además de ser observada en humanos, esta relación también fue observada en ratones (Kataoka et al., 2011). Las crías hembras fueron sacrificadas mientras que las crías macho fueron distribuidas de a 4-5 por jaula. Se las identificó con marcas en las orejas. Los animales no fueron perturbados más que para la limpieza periódica semanal de las jaulas hasta la semana 8 de vida.

### II.1.2.2 Evaluación del desarrollo

A fin de evaluar posibles efectos de los tratamientos en el desarrollo neonatal se observó la presencia de marcadores físicos que hacen su aparición en días de vida determinados en los ratones. A cada animal se le asignó un puntaje cada día según lo observado: separación de orejas (ninguna oreja separada: 0, una oreja separada: 1, dos orejas separadas: 2), aparición de pelo (sin pelo: 0, con pelo: 1) y apertura de ojos (ningún ojo abierto: 0, un ojo abierto: 1, dos ojos abiertos: 2). Estos marcadores suelen mantenerse de manera constante entre las distintas camadas, por lo que son útiles para evaluar un correcto desarrollo físico.

Se controló también la ganancia de peso entre el DP4 y el DP21, de manera de evaluar el posible efecto que los tratamientos prenatales podrían tener sobre esta variable, y poder así detectar posibles alteraciones en el desarrollo postnatal.

### *II.1.3 Ratones CrlFcen:CF1*

Recibimos a los animales de esta sub-cepa a los 2 meses de edad, provenientes de la sala de cría del Bioterio Central de la FCEN. Se los identificó con marcas en las orejas y se los mantuvo en la sala durante una semana antes de realizar cualquier procedimiento. Cuando fue necesario inyectar con ayuda de un marco esterotáxico, se trasladó a los animales a otra sala donde fueron inyectados intracerebelarmente con solución salina o LPS (ver sección II.2.3). Se los dejó recuperar allí mismo, sobre una almohadilla térmica, y al despertar se los devolvió a su sala.

## II.2 Inyecciones

### *II.2.1 Inyecciones de VPA*

Al DG12.5, a cada ratona BALB/c preñada se le asignó uno de los siguientes tratamientos de manera aleatoria: CON, VPA400 o VPA600. Las ratonas del grupo control (CON) recibieron una inyección de solución salina,

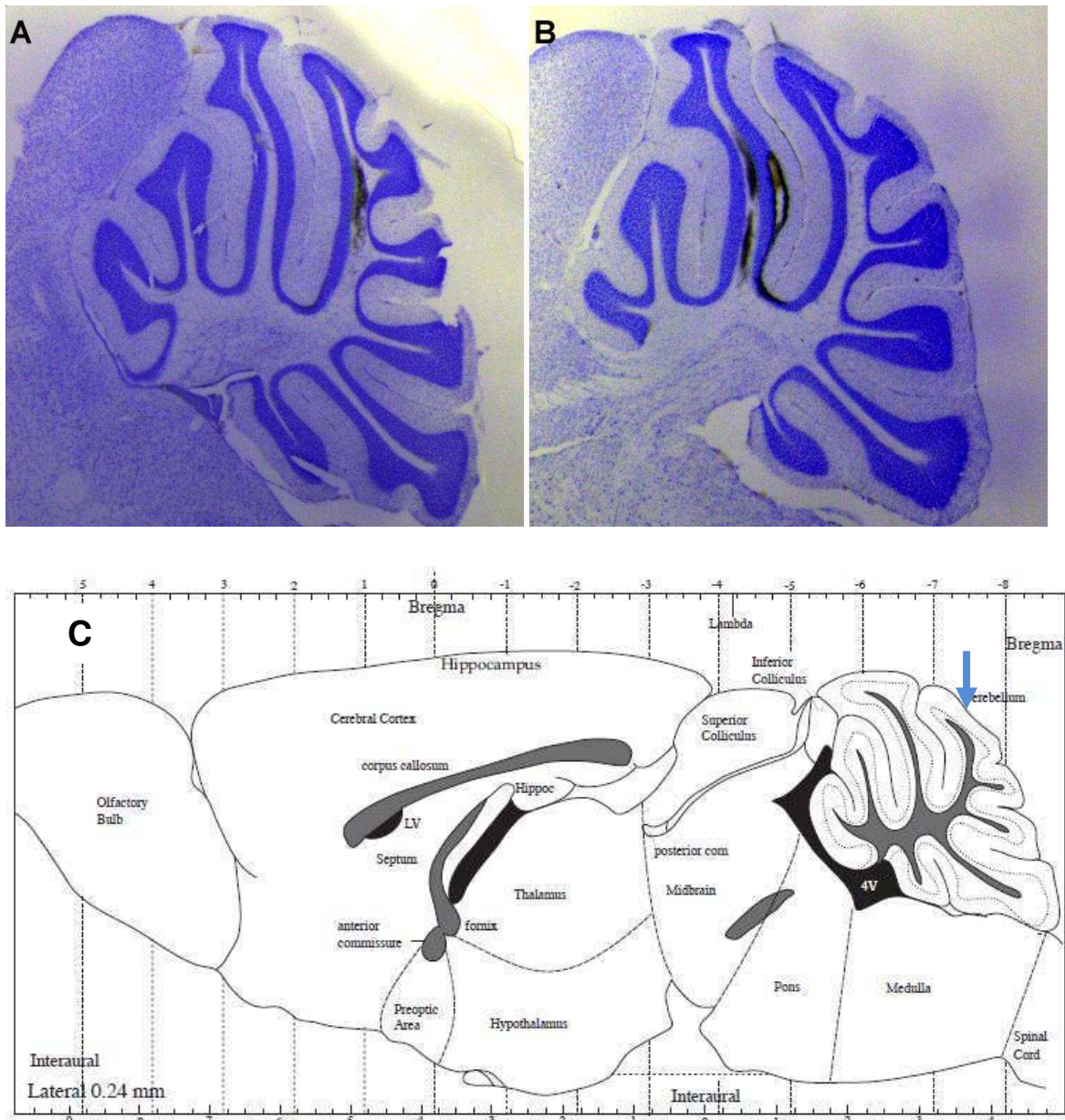


las del grupo VPA400 una inyección de 400 mg/Kg de valproato de sodio (VPA) y las del grupo VPA600 una inyección de 600 mg/Kg de VPA. El VPA (sal de sodio del ácido 2-propilpentanoico, Sigma, St. Louis, MO-USA) fue disuelto en solución salina. La inyección se realizó en el pliegue de la nuca de manera subcutánea, utilizando agujas 27G y el volumen de inyección fue aproximadamente de 100 µl (dependiendo del peso). La inyección se realizó rápida y suavemente, teniendo especial cuidado en la manipulación, de modo de minimizar posibles causas de estrés para el animal. La elección del día de gestación y de las dosis inyectadas fue tomada luego de evaluar los resultados de trabajos de otros grupos de investigación, como se menciona en la Introducción (ver sección Modelo de exposición a VPA).

A fin de controlar el efecto de la inyección de VPA a corto plazo sobre el animal que recibe la inyección, realizamos un experimento independiente en el que inyectamos a hembras vírgenes de la cepa BALB/c de dos meses de edad con la misma dosis de VPA que la usada para las ratonas preñadas o solución salina como control. A las dos horas de la inyección les extrajimos sangre para realizar un RIA (ver más adelante, sección II.4)

### *II.2.2 Inyecciones en la adultez*

El lipopolisacárido (LPS) es una molécula que se encuentra en la pared de bacterias gram-negativas. Resulta un potente inflamógeno que despierta una respuesta inespecífica y aguda del sistema inmune (Bilbo et al., 2007). A fin de provocar esta respuesta y poder evaluar posibles diferencias, se inyectó a la mitad de los animales de los distintos grupos con LPS (serotipo 0111:B4, Sigma) o con solución salina (SAL). La dosis utilizada fue de 25 µg/Kg de LPS ya que hemos visto en el laboratorio que esta dosis ocasiona un aumento de corticosterona en plasma a las 2 horas de recibir la inyección. La inyección se realizó de manera intraperitoneal con agujas 27G y un volumen final aproximado (ya que depende del peso) de 100 µl.



**Figura II.2. Puesta a punto de la inyección estereotáxica.** Las pruebas con tinta china muestran que una diferencia en la alineación entre la nariz y las orejas usando las mismas coordenadas nos permiten inyectar en el lobulillo 6/7 (A) o en el lobulillo 4/5 (B). La flecha azul señala las coordenadas elegidas para la inyección (C).

### II.2.3 Inyección en el cerebelo

Los animales CF1 del grupo ISI (ver luego sección II.3.3) fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (150 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg), y ubicados en un aparato de estereotaxis (Stoelting). Se realizaron inyecciones en el lobulillo VI/VII o el lobulillo IV/V del vermis cerebelar. Las coordenadas de inyección fueron determinadas a partir del atlas de ratón

(Paxinos y Franklin, 2004) y confirmadas realizando pruebas con tinta china (figura II.2). Para los dos casos, se utilizaron las siguientes coordenadas: - 0.69 mm antero posterior, -0.10 mm dorso ventral a partir del bregma. La diferencia se generó cambiando la orientación de la cabeza del animal: para el lobulillo VI/VII las barras que sostienen las orejas se mantuvieron al mismo nivel que la barra que sostiene los dientes, mientras que para el lobillo IV/V las barras de las orejas se colocaron 3 mm más arriba que la barra de los dientes.

La inyección estereotáxica se realizó con un capilar de vidrio estirado (diámetro aproximado de 50  $\mu\text{m}$ ), de modo de minimizar el daño causado por la inyección en el tejido nervioso. El LPS se disolvió en solución salina estéril, a una concentración final de 0.1 mg/ml. Se inyectó un volumen final de 1  $\mu\text{l}$ . Las inyecciones se realizaron en un periodo de 6 minutos: en los primeros cuatro se inyectó 0.25  $\mu\text{l}$ /minuto, se mantuvo el capilar en el lugar durante un minuto adicional a fin de evitar el reflujo de la solución y luego se retiró el capilar en dos veces, con 1 min de espera. Finalmente se procedió a limpiar y cerrar la herida pegándola con pegamento (La Gotita, Akapol S.A., BA-Argentina) y dejando la zona embebida en iodopovidona (Pervinox, Laboratorios Phoenix, BA-Argentina) a fin de minimizar infecciones e inflamaciones locales. Los animales se mantuvieron sobre almohadilla térmica hasta recuperarse de la anestesia y luego fueron devueltos a su jaula.

## II.3 Comportamiento

### *II.3.1 Comportamiento de crías*

El momento de exposición al VPA corresponde al cierre del tubo neural y al final de la fase de generación de células de Purkinje en el ratón (Inouye y Murakami, 1980). Por estas razones, evaluamos comportamientos que dependen del correcto funcionamiento del cerebelo: reflejo de enderezamiento, y fuerza de agarre. También se evaluó la locomoción general de las crías en un ensayo de campo abierto.

#### II.3.1.1 Reflejo de enderezamiento sobre la superficie

Cada ratón fue colocado con cuidado sobre su dorso y se cuantificó la latencia a girar sobre sí mismo y a apoyar las 4 patas sobre la superficie. El tiempo máximo fue de 30 segundos. Los ratones fueron testeados diariamente entre los días postnatales (DP) 4 y 8 de vida (Wagner et al., 2006).

#### II.3.1.2 Fuerza de agarre

El ratón fue colocado en el centro de la grilla y la grilla fue invertida y mantenida a 25 cm sobre una superficie con mucha viruta. La latencia a caer fue medida, con un máximo de 60 segundos por ensayo. Los ratones fueron testeados diariamente entre el DP13 y el DP18 (Wagner et al., 2006).

#### II.3.1.3 Campo abierto

A fin de analizar la actividad locomotora general de los animales, se los colocó en un campo abierto el DP14, DP21 y DP28 y se cuantificó la distancia recorrida. El campo abierto es una caja, con paredes de 30 cm de alto de fórmica negra y piso de PVC gris. Para el ensayo el DP14 y el DP21 usamos una caja más pequeña que la usada comúnmente, de modo de minimizar el estrés y favorecer la locomoción (28 cm x 28 cm, 30 lux). Para los animales de 28 días, usamos la misma caja que con los adultos (45 cm x 45 cm, 30 lux). El ensayo duró 5 minutos, y los animales fueron filmados y el comportamiento analizado mediante el software de seguimiento digital (AnyMaze).

### *II.3.2 Comportamiento de animales adultos*

Entre la octava y décima semana de vida de los animales se comenzó con la evaluación de los posibles efectos de la exposición prenatal al VPA sobre el comportamiento. Se analizaron los ratones adultos de manera secuencial en diversas pruebas comportamentales, con una separación entre ensayos de una semana. Todos los ensayos se llevaron adelante de la siguiente manera: 45 minutos antes de comenzar, la luz que recibían en la sala de residencia fue modificada (ver en cada ensayo). El orden de las

jaulas fue establecido al azar. Cada animal fue retirado, evaluado, identificado y colocado en una jaula limpia. Una vez testeados todos los animales de la misma jaula, los mismos fueron devueltos a su jaula original. Todos los laberintos o arenas experimentales fueron limpiados con etanol 20% entre sesiones, excepto el de natación forzada, en el que el agua de cada recipiente fue cambiada cada 2 ratones.

#### II.3.2.1 Ensayo de interacción social

En este ensayo se ponen en evidencia los niveles de interacción social de los animales (Depino et al., 2011). Fue realizado en una caja negra dividida en tres compartimientos (compartimientos laterales: 15 x 15 cm, compartimiento central: 10 x 15 cm, 25 lux), con aberturas de 7.5 cm de ancho que comunican los compartimientos (Figura II.3-A). El piso estuvo cubierto de viruta limpia. Dos cilindros transparentes de Plexiglass (7.5 cm de diámetro, con varios agujeros que permiten el paso del hocico) fueron colocados en los compartimientos laterales desde el principio del ensayo (Figura II.3-B). Los animales fueron colocados en el compartimiento central y se les permitió explorar libremente la caja durante 5 minutos (fase de habituación). Se cuantificó la locomoción durante esta fase. Luego, un ratón macho, de 3 semanas de edad y desconocido (estímulo social) fue colocado en uno de los cilindros, elegido al azar. A este compartimiento se lo denominó "lado social". La interacción social fue evaluada durante 10 minutos.

La locomoción fue cuantificada por medio del programa de seguimiento digital (ANY-maze, Stoelting, IL-USA), de manera automática para los animales de la F1 (distancia en metros) y manualmente para los de la cepa CF1 (transiciones de un compartimiento a otro). Se realizó de esta manera debido a la imposibilidad del programa de seguir a los ratones CF1 (animales de pelaje blanco) sobre el fondo de color claro (el color de la viruta).

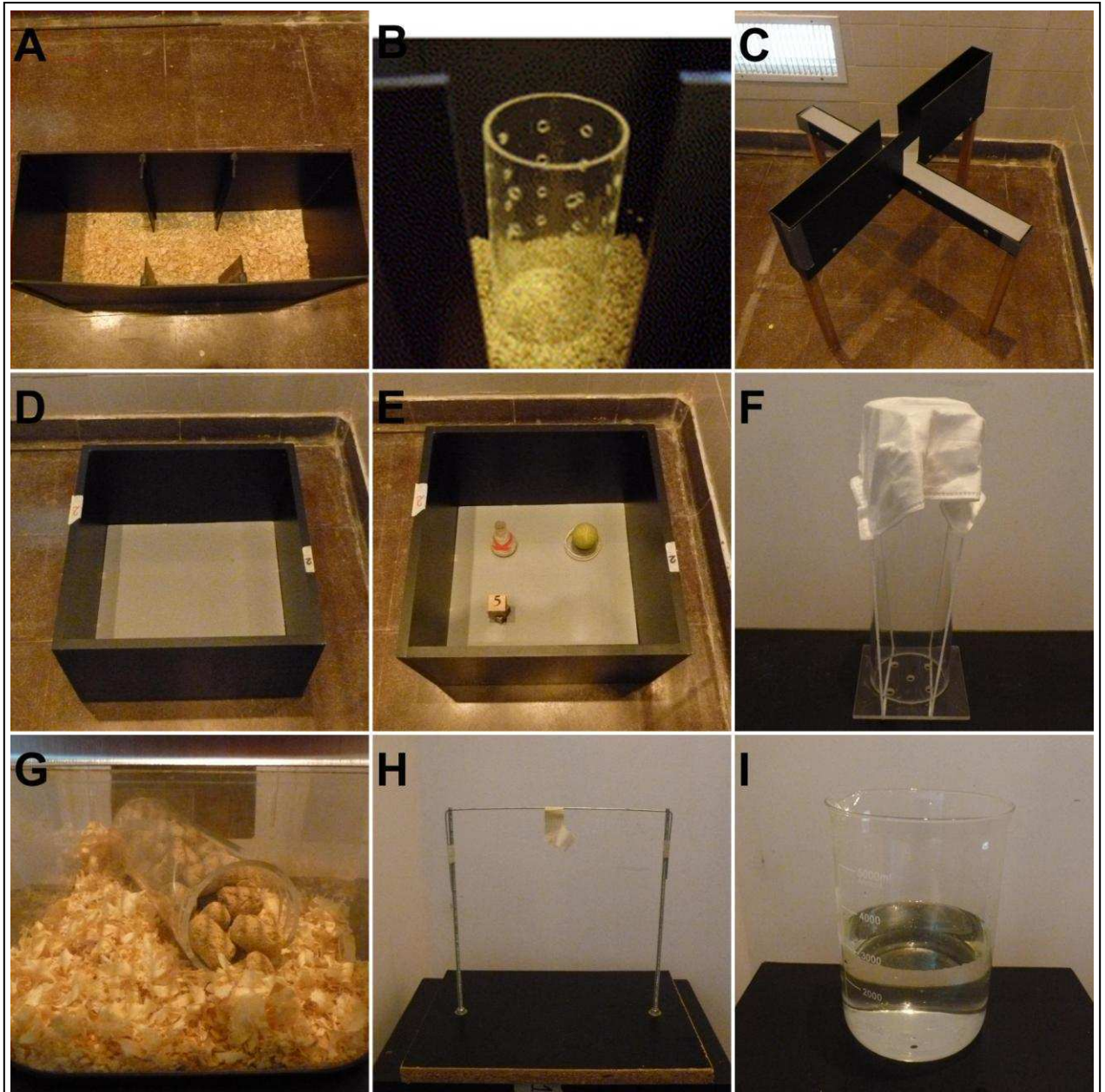
Con respecto a la interacción social, en el primer grupo (animales de la F1) medimos tanto el tiempo que los animales pasaban en cada compartimiento como el tiempo que pasaban olfateando al ratón extraño (animal con el hocico dentro de algún orificio del cilindro o dirigido hacia él).

Debido a que el dato más representativo para la interacción social fue el del tiempo olfateando al estímulo social, decidimos cuantificar solo esto en el segundo grupo (animales de la cepa CF1).

#### II.3.2.2 Laberinto elevado en cruz

Este ensayo permite evaluar los niveles de comportamiento asociado a la ansiedad en los animales (Carobrez y Bertoglio, 2005). Consiste en un laberinto en forma de cruz elevado 50 cm del piso y compuesto por dos brazos cerrados y dos abiertos (Figura II.3-C). Cada brazo mide 30 cm de largo y 5 cm de ancho. Los brazos están realizados con PVC negro y el piso con PVC gris claro. Los brazos abiertos están rodeados por un borde de 5 mm de alto, mientras que los brazos cerrados por paredes de 19 cm de alto. La iluminación es provista por una lámpara de 150W dirigida hacia arriba, ubicada a 130 cm del piso (de esta manera se obtienen 100 lux en el centro del laberinto).

El animal fue ubicado con el cuerpo en el centro de la cruz (5cm x 5cm), mirando hacia un brazo abierto, pudiendo elegir libremente entre los brazos abiertos (altamente ansiogénicos) y los cerrados (menos ansiogénicos). El ensayo duró 5 minutos, y se cuantificó: distancia total en el laberinto, tiempo en el centro, distancia en el centro, tiempo en los extremos, distancia en los extremos, tiempo en los brazos abiertos, distancia en los brazos abiertos, tiempo en brazos cerrados y distancia en brazos cerrados. El tiempo y la cantidad de veces que los animales pasaron acicalándose, explorando verticalmente y asomando la cabeza fue cuantificado manualmente a partir del video.



**Figura II.3. Dispositivos empleados en los ensayos comportamentales llevados adelante en los ratones adultos.** Caja usada en el ensayo de interacción social (A) y los tubos en los que se ubica tanto al estímulo social como al no social (B). Laberinto elevado en cruz (C). Caja del campo abierto (E). Caja y objetos para el ensayo de reconocimiento de objeto nuevo (D). Tubo en el que se coloca al animal para evaluar el acicalamiento (F). Jaula con el tubo para evaluar la excavación (G). Dispositivo para el ensayo de suspensión por la cola (H). Vaso en el que se evalúa la natación forzada (I). La iluminación en las fotografías no es la utilizada en cada ensayo, es la necesaria para visualizar bien los objetos.

### II.3.2.3 Campo abierto

Este ensayo permite evaluar los niveles de comportamiento relacionado con la ansiedad (Bailey KR, 2009). El ensayo consiste en enfrentar al animal a un ambiente amplio y novedoso cuyo centro es

altamente ansiogénico (iluminado y desprotegido) y donde los animales experimentan tigmotaxia hacia las paredes (Prut y Belzung, 2003). La medida de la caja usada como arena experimental es 30 cm x 45 cm x 45 cm (alto x ancho x largo), con una intensidad de luz de 30 lux (Figura II.3-D). Se delimita el centro como un cuadrado que dista 13 cm de las paredes.

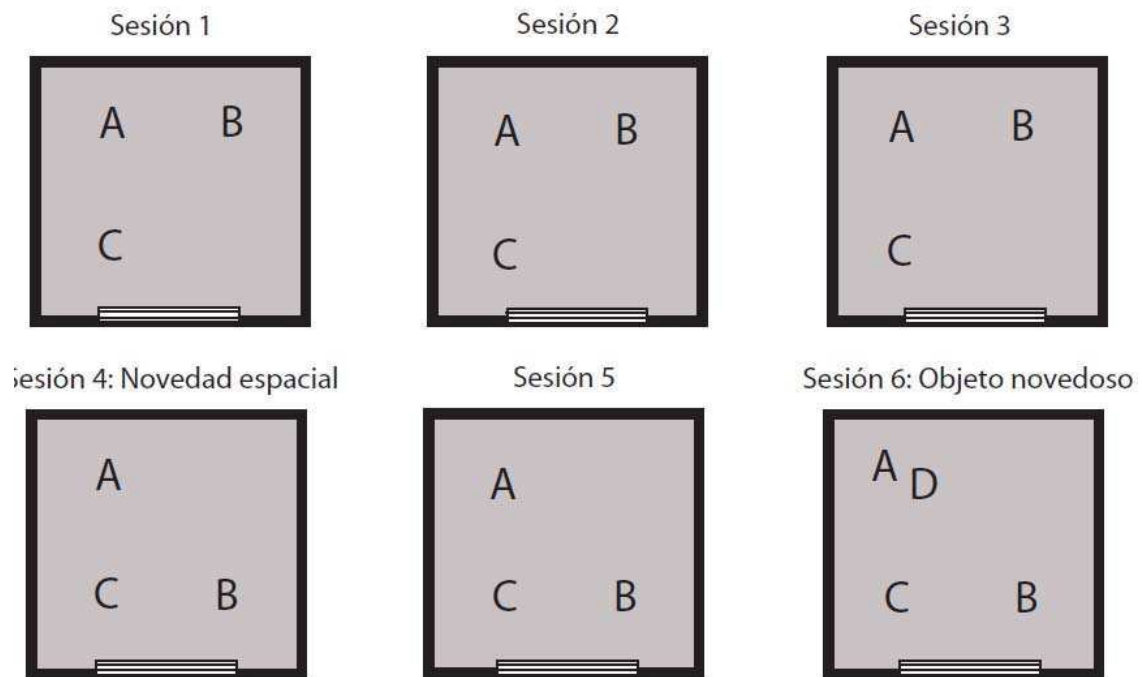
Se colocó al animal contra una de las paredes del campo y se cuantificó: distancia total, entradas al centro, tiempo en el centro, distancia en el centro, latencia al centro, tiempo en la periferia, y distancia en la periferia. El ensayo duró 5 minutos. El número de eventos y el tiempo que el animal pasa acicalándose o en exploración vertical fueron medidos manualmente.

#### II.3.2.4 Reconocimiento de un objeto novedoso

Para analizar alteraciones en la memoria espacial y en el reconocimiento de un objeto novedoso, utilizamos una versión del ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) (Dere et al., 2007). El ensayo de NOR fue realizado en la misma caja y con la misma iluminación que el ensayo de campo abierto (Depino et al., 2008) (Figura II.3-E). Éste consta de 6 fases que se detallan en la Figura II.4. Cada fase dura 5 minutos y el intervalo entre fases es de 3 minutos, a excepción del intervalo entre la fase 3 y la 4 que es de 1 hora. Entre sesiones los ratones fueron ubicados en jaulas individuales con aserrín nuevo. Se cuantificó de manera manual el tiempo que el animal pasa oliendo cada objeto, con ayuda del software ANY-maze.

Los objetos utilizados fueron un erlenmeyer recubierto con cinta de papel blanca (objeto A), una pelota de tenis pegada a una placa de petri (objeto B), dos cubos de madera pegados entre sí (objeto C), y una caja para colocar puntas de pipetas o "tips" (objeto D). Los objetos fueron ubicados a 12.5 cm de cada pared.





**Figura II.4. Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR).** Las sesiones 1 a 3 permiten habituar al animal a tres objetos. En la sesión 4, un objeto conocido es cambiado de lugar (novedad espacial). Los animales se habitúan a esta nueva disposición espacial (sesión 5). En la sesión 6 se incorpora un objeto nuevo. El rectángulo rayado simboliza un papel rayado que se ubicó en una de las paredes como referencia espacial para los animales. Se cuantificó el tiempo que el animal pasa explorando cada objeto. El criterio de exploración utilizado fue que el hocico del animal se encontrase a menos de 1 cm del objeto. No se consideró exploración cuando el animal se apoyaba sobre el objeto para olfatear el aire.

El campo abierto se dividió virtualmente en 4 cuadrantes. En una de las paredes se ubicó un papel blanco rayado a fin de que los animales tuviesen una referencia espacial dentro de la caja. En 3 de estos se colocó un objeto (A-B-C), dejando el cuarto cuadrante vacío. En las 3 sesiones de habituación se mantuvo la misma configuración, sin limpiar el campo entre ellas, solo retirando los excrementos en caso de que los hubiera. Luego de una hora se realizó la sesión 4, en la que se incorporó la *novedad espacial*: el objeto B fue desplazado al cuadrante vacío. En la sesión 5 se mantuvo esa configuración de modo de que el ratón se habituase a ella. En la sesión 6 se incorporó el *objeto novedoso*: se agregó al objeto D en el mismo cuadrante que el objeto A. En todas las sesiones se introdujo al ratón enfrentando el rincón del cuadrante vacío.

A fin de relativizar a la exploración propia de cada ratón, expresamos los datos como porcentaje de tiempo que los animales pasan explorando al objeto movido o al objeto nuevo, respecto al tiempo total de exploración (suma del tiempo que pasa explorando cualquier objeto; 3 objetos en la sesión 4, 4 objetos en la sesión 6). Como se muestra en la figura II.3, el objeto desplazado es siempre el B, mientras que el objeto nuevo es siempre el D.

#### II.3.2.5 Acicalamiento

El acicalamiento es un comportamiento típico de los roedores, que puede ser estimulado por situaciones estresantes (Crawley, 2012). Este comportamiento fue evaluado en un tubo de Plexiglas transparente de 5.5 cm de diámetro y 20 cm de alto, tapado con un barbijo de modo que el ratón no pueda escapar (figura II.3-F). Los ratones fueron habituados a este tubo 2 días consecutivos durante una hora y el tercer día fue evaluado el acicalamiento, cuantificándolo durante 10 min, luego de un período de 10 min de habituación. La cuantificación se realizó con el investigador sentado a 1 metro, y registrando con un cronómetro el tiempo acumulado que el ratón pasa acicalándose (Depino et al., 2011).

#### II.3.2.6 Excavación (burrowing)

La excavación es un comportamiento espontáneo y repetitivo de los roedores. Se ha visto que este ensayo es muy sensible a estímulos que causan enfermedad, considerándose que la falta de este comportamiento es un síntoma de comportamiento relacionado con la enfermedad (*sickness behavior*) (Deacon, 2009). A fin de que los animales se habituasen a los elementos con los que se evaluó este comportamiento, la noche previa al ensayo se colocó un tubo lleno de pellets en la jaula grupal. El tubo consiste en un cilindro plástico, de 20 cm de largo y 7 de diámetro, cerrado en uno de los extremos, y lleno de 200 g de la comida en forma de pellets que normalmente comen los ratones (figura II.3-G). El lado abierto se encuentra levantado 2 cm del suelo para evitar la caída accidental de los pellets.

El ensayo consiste en colocar un ratón durante dos horas en una caja limpia, con viruta y el tubo lleno de pellets. Luego de las dos horas se

cuantifica la cantidad de pellets desplazada por cada ratón, pesando la comida remanente en el tubo.

#### II.3.2.7 Suspensión por la cola

Este ensayo es utilizado para evaluar comportamientos relacionados con la depresión (Cryan et al., 2005). Consiste en sujetar a los animales con cinta adhesiva del tercio más distal de la cola a un alambre fijo, de modo que queden suspendidos en el aire a 25 cm de una superficie (Figura II.3-H). Al no poder escapar, los animales desarrollan una postura inmóvil después de un corto periodo de tiempo. Se interpreta esta inmovilidad como una "desesperanza", y la misma disminuye cuando los animales son tratados con drogas anti depresivas. Se midió el tiempo que el ratón permanecía inmóvil, sobre un total de 5 minutos. Si el ratón se subía al alambre, el ensayo se daba por terminado y el ratón no era tenido en cuenta en el análisis.

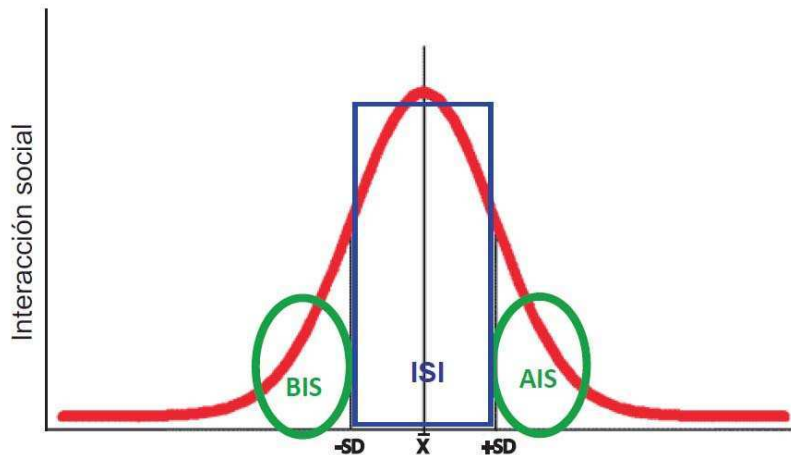
#### II.3.2.8 Natación forzada

Este ensayo es también conocido como ensayo de Porsolt y es utilizado para evaluar comportamientos relacionados con la depresión (Castagne et al., 2011). Los animales fueron ubicados en un vaso de precipitados de vidrio de 4 litros (15 cm de diámetro y 25 cm de altura) con 14 cm de agua a 25°C. Se midió el tiempo que el ratón pasaba inmóvil en el agua, sobre un total de 5 minutos (Figura II.3-I). Al retirarlos del agua, los ratones eran secados con una toalla de papel y colocados en una jaula con aserrín seco antes de ser devueltos a su jaula. El agua fue cambiada luego de evaluar cada jaula (David et al., 2003).

### *II.3.3 Selección de animales de baja y alta interacción social*

Habituamos durante una semana a ratones naive adultos machos de la cepa CF1 a la sala de comportamiento. Realizamos el ensayo de interacción social y luego de evaluar sus niveles de interacción social, armamos 3 grupos: baja interacción social (BIS), alta interacción social (AIS) e interacción social intermedia (ISI). Los límites usados para separar los grupos fueron los desvíos estándar: los animales de BIS fueron los que

mostraron una interacción social menor a la media menos un desvío, los de AIS fueron los que mostraron una interacción social mayor a la media más un desvío. Los de ISI fueron los que mostraron niveles de interacción entre la media menos un desvío y la media más un desvío (ver figura II.5)



**Figura II.5. Distribución de animales para el capítulo V.** Luego de hacer un ensayo de interacción social distribuimos a los animales en tres grupos clasificándolos según el nivel de interacción social mostrado. Los grupos fueron: baja interacción social (BIS), interacción social intermedia (ISI) y alta interacción social (AIS). X: media, SD: desvío estándar.

#### II.4 Radioinmunoensayo

Realizamos un radioinmunoensayo (RIA) para corticosterona en plasma a partir de sangre troncal en tres contextos experimentales distintos (el diseño experimental se detalla en cada capítulo):

- i) A los ratones F1 luego de la batería de ensayos comportamentales se le inyectó solución salina o LPS (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).
- ii) A ratones naive hembras de la cepa BALB/c, se le inyectó solución salina o VPA (600mg/kg).
- iii) A ratones CF1 pertenecientes a los grupos de baja interacción social y de alta interacción social se le inyectó solución salina o LPS (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Todas las inyecciones se realizaron por la mañana (entre las 8:00 y las 9:00). A las dos horas de la inyección los animales fueron anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (150 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg) y

se les extrajo la sangre desde el corazón con aguja 21G heparinizada. La sangre fue colectada en tubos eppendorff heparinizados y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 1000g durante 15 minutos. Se separó el plasma, que fue guardado a -20°C hasta la extracción de esteroides.

La extracción de esteroides se realizó a partir de 100 µl de plasma al que se le agregó 500 µl de éter etílico, se mezcló bien y se congeló durante 30 min en freezer -80°. Se extrajo la fase orgánica y se reservó en un tubo, mientras que a la fase acuosa restante se le agregaron 300 µl de éter etílico y se repitió el procedimiento anterior. Se agregó la segunda fase orgánica a la recogida anteriormente. Se dejó secar intensamente en campana y luego se resuspendió en 100 µl de buffer B (Tris pH 8, 0.05M, NaCl, 0.1M, Azida zódica 0.1% y BSA 0.1%).

Se realizó una curva de calibración de corticosterona con concentraciones conocidas y crecientes para poder luego estimar las concentraciones de corticosterona en las muestras. La curva de calibración abarcó un rango de concentraciones entre 200 pg/ml y 2500 pg/ml (realizadas a partir de una solución estándar de 2 µg/ml corticosterona en etanol; Sigma) y una cantidad fija del marcador radioactivo (10000 dpm de 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-corticosterona; Perkin-Elmer, Whaltman, MA-USA) con una actividad específica de 70000 µCi/mmol.

El protocolo llevado adelante fue el provisto por la hoja de datos del anticuerpo primario (C8784, Sigma): se colocó en un tubo de polipropileno 100 µl de solución estándar o muestra más 500 µl de una dilución 1:30 de anticuerpo anti-corticosterona en buffer AB (Tris pH 8, 0.05M, NaCl, 0.1M, Azida zódica 0.1%). Se mezcló con vortex y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó a cada tubo corticosterona tritiada diluida en buffer B (1:10000). Se mezcló y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se detuvo la reacción enfriando durante 15 minutos a 4°C. Se le agregó a cada tubo 200 µl de una mezcla de carbón activado (0.5%) y dextrano (0.05%; Sigma) en buffer B, fría y en suspensión. Se mezcló y se incubó en hielo durante 10 minutos a 0°C. Se centrifugó a 2000g por 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se

le agregó líquido de centelleo (Optiphase Hisafe 3, Perkin-Elmer) y se determinó la radiactividad en un contador WALLAC.

Las cuentas totales fueron determinadas incubando el radioactivo solo, es decir en ausencia de corticosterona, anticuerpo y de la mezcla de carbón-dextrano. La unión no específica se calculó incubando la corticosterona radioactiva en ausencia de corticosterona sin marcar (fría) y anticuerpo. El unido máximo se determinó mediante la incubación en presencia de anticuerpo y carbón-dextrano, y en ausencia de corticosterona fría.

## II.5 Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real

Para la extracción de ARN, las muestras fueron procesadas con la ayuda de un homogeneizador (Omni TH Tissue Homogenizer, Kennesaw, GA- USA). Según la estructura se utilizaron 1ml (hipocampo y corteza) o 1.5 ml (bazo y cerebelo) de Trizol (Sigma). Los homogenatos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se mantuvieron en hielo hasta que se terminaron de procesar la totalidad de las muestras. A continuación se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo/ml de Trizol utilizado, se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 15 minutos. Luego de 15 minutos de centrifugación a 1200 rpm a 4°C, se removió cuidadosamente la fase acuosa y se mezcló con 500  $\mu$ l de isopropanol frío. Se precipitaron las muestras durante 45 minutos a -20°C, y se centrifugaron a 1200rpm a 4°C durante 10 minutos. El exceso de sal se eliminó con etanol al 70% y luego el RNA se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua libre de ARNasas. El ARN se cuantificó mediante un nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware-USA). Se utilizaron 10  $\mu$ g de ARN para hacer la transcripción reversa con primers Oligo-dT de acuerdo a lo indicado por el fabricante (Superscript II, Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA-USA). Una muestra sin transcriptasa reversa se utilizó como control de contaminación genómica.

La cuantificación comparativa se realizó por PCR en tiempo real, utilizando el método fluorescente de SYBR-green, y ROX como referencia pasiva. Se utilizó el equipo Stratagene Mx3005P y el programa Stratagene MxPro TM QPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA-USA). Para cada molécula, las muestras se corrieron en paralelo con una curva estándar que fue utilizada para transformar los Cts a valores relativos de dilución de ADNc (ADN copia). Los niveles de ADNc de las citoquinas fueron normalizados utilizando el nivel de ADNc de  $\beta$ 2-microglobulina, debido a que su expresión no varió entre tratamientos (datos no mostrados). Todas las muestras se corrieron por triplicado. La especificidad fue controlada por curvas de fusión y electroforesis en geles de agarosa. Los valores son expresados como un porcentaje del grupo CON-Sal. Las secuencias y el tamaño de los productos de amplificación se especifican en la tabla II.1. Todos los primers fueron diseñados de forma de distinguir entre el ARNm y el ADN, ya que flanquean un intrón.

Molécula	5' primer	3' primer	Tamaño del producto
IL-1 $\beta$	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	204
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTIONCAGGTAGCTATGG	208
TNF- $\alpha$	TTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	212
TGF- $\beta$ 1	TGACGTCACCTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTCATGGATGGTGC	170
$\beta$ 2m	TGACCGGCTTGTATGCTATC	CAGTGTGAGCCAGGATATAG	222

**Tabla II.1.** Primers usados en el análisis de la expresión de citoquinas por PCR en tiempo real y los tamaños esperados de sus productos.

## II.6 Procesamiento de tejidos para histología

Para los análisis histológicos, los animales fueron anestesiados profundamente con clorhidrato de ketamina (150 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg) y perfundidos transcardíacamente con solución salina heparinizada (0,9% NaCl, 0.20 U/ml de heparina; aproximadamente 5 ml por ratón) seguido de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PB) 0.1M, pH= 7.2 (50 ml por animal). Las perfusiones se realizaron a un flujo constante (5 ml/min) utilizando una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Palmer Instrument Co., IL-USA). Los cerebros fueron extraídos y post-fijados durante 5-6 hs en la misma solución fijadora a 4°C. Luego los tejidos fueron criopreservados mediante inmersión en una solución conteniendo 30% de sacarosa en PB, hasta que los cerebros adquirieron mayor densidad que la solución. Finalmente fueron congelados en una solución de isopentano (J.T.Baker, NJ-USA) enfriada en un baño de etanol puro y hielo seco. Las regiones del cerebro a estudiar fueron entonces cortadas de manera seriada en un crióstato (Leica). Los cerebros fueron cortados en el plano coronal mientras que los cerebelos fueron cortados paralelos al plano sagital. Los cortes de 40 µm de grosor fueron guardados de manera seriada en 12 pocillos conteniendo una solución de criopreservación (3 vol de glicerol, 3 vol de etilenglicol, 4 vol de 0.1 M buffer fosfato) a -20°C hasta ser usados.

### *II.6.1 Tinción con violeta de cresilo*

A fin de analizar el estado del sistema nervioso se realizó una tinción con violeta de cresilo. Este colorante es un colorante basófilo que tiñe núcleos y citoplasma perinuclear de somas neuronales, como también núcleos de células gliales y del infiltrado inflamatorio. Para hacer esta tinción, retiramos los cortes de la solución criopreservadora, y los montamos en portaobjetos gelatinizados, pasándolos por PB. La gelatinización de los portaobjetos es necesaria para que los cortes no se despeguen. Una vez montados y secos, se procedió a rehidratar el tejido, haciendo pasajes sucesivos por etanol 96% y 70% de 1 minuto de duración. Luego se sumergieron los vidrios en el colorante (0.5 gr de Cresyl, 100 ml de acetato de sodio 0.1 M, pH 3.8) durante 2 minutos y luego se



deshidrataron, haciendo pasajes sucesivos de etanol 70%, etanol 96% y etanol 100% de 1 minuto de duración. Posteriormente se aclararon haciendo 3 pasajes por xilol, también de 1 minuto cada uno. Finalmente se les agregó el cubreobjetos, montándolos con bálsamo sintético de Canadá (Biopack, BA-Argentina).

### *II.6.2 Inmunohistoquímicas*

Para la detección de distintos tipos celulares se realizaron distintas inmunohistoquímicas, todas ellas por el método de flotación libre ("free-floating"), método de uso corriente en el laboratorio. Consiste en pasajes sucesivos de los cortes flotantes desde el pocillo con solución criopreservadora en el que se conservan a distintos pocillos en los que se llevan adelante los sucesivos pasos del protocolo con todos los cortes flotando juntos. Al terminar, cada pocillo es montado en un vidrio gelatinizado del modo ya descrito para la tinción con violeta de cresilo.

En todos los casos se utilizó suero de burro para bloquear el pegado inespecífico de proteínas (Jackson Laboratories, West Grove, PA-USA), anticuerpos primarios específicos, reconocidos por anticuerpos secundarios biotinilados (Jackson) y el kit de amplificación Vectastain Standard ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA-USA), un complejo de avidina y peroxidasa biotinilada que se une al anticuerpo secundario biotinilado. Luego se reveló la acción de la peroxidasa utilizando como sustrato a la 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, 0.5mg/ml en 0,1M buffer fosfato, filtrado), molécula que en presencia de  $H_2O_2$  se oxida generando un precipitado de color que permite evidenciar la presencia y localización de la peroxidasa. Luego del último lavado, los cortes fueron montados en vidrios portaobjetos gelatinizados y se los dejó secándose durante toda la noche. Se realizaron 2 pasajes sucesivos de los vidrios por etanol 96% y 2 por etanol 100% de 1 minuto de duración, seguido de 3 pasajes por xilol, también de 1 minuto cada uno. Finalmente se les agregaron los cubreobjetos, montándolos con bálsamo sintético de Canadá (Biopack). La placa multipocillo se mantuvo siempre en agitación en un agitador orbital a temperatura ambiente.

### II.6.2.1 Inmunohistoquímica anti GFAP

La proteína glial fibrilar acida (GFAP) es una de las proteínas fibrilares que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular. Se expresa de manera constitutiva en los astrocitos. Para detectarla, las secciones flotantes fueron lavadas 3 veces en buffer fosfato salino (PBS) conteniendo 0.1% de detergente Tritón-X100 (Tx) durante 10 minutos y luego fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol en una relación 1:60 durante 20 minutos, para bloquear la acción de las peroxidasas endógenas. Se lavaron 2 veces con PBS-Tx 0.1% durante 15 minutos y se bloqueó el pegado inespecífico de proteínas con una solución 1% de suero de burro en buffer PBS-Tx 0.1% durante 90 minutos. Las secciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti GFAP hecho en conejo (1:700, DAKO, Glostrup-Denmark) toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente fueron lavadas 2 veces en PBS-Tx 0.1% durante 15 minutos e incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (Jackson). Fueron lavadas nuevamente en PBS-Tx 0.1% durante 10 minutos y 2 veces en PB; cada lavado fue de 10 minutos. Se incubaron con el kit comercial del complejo de avidina-biotina durante 2 horas, se lavaron 2 veces con PB durante 15 minutos, se realizó el revelado de las secciones con una solución de DAB (10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10µl de NiCl<sub>2</sub>, 250 µl de DAB, 750 de µl PB) y finalmente se lavaron 3 veces con PB durante 10 minutos antes de montar en portaobjetos.

### II.6.2.2 Inmunohistoquímica anti CD11b

CD11b es una proteína de superficie, parte de un complejo heterodimérico (CD11b/CD18). En ratón se expresa en monocitos, macrófagos y microglia de manera constitutiva. Su expresión en la microglia aumenta en condiciones de neuroinflamación (Bilbo et al., 2005; Bilbo et al., 2007). Para detectar esta proteína realizamos el siguiente protocolo: se realizaron lavados sucesivos de 10 minutos de las secciones flotantes, 2 veces en buffer tris salino conteniendo 0.1% de Tx (TBS-Tx 0.1%) y 2 veces en TBS-Tx 1%, luego fueron tratadas con 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 10 minutos para bloquear la acción de las peroxidasas endógenas. Se lavaron 2 veces con TBS-Tx 1%, y el pegado inespecífico de proteínas fue bloqueado con una solución 1% de suero de burro en buffer TBS-Tx 1%

durante 90 minutos. Las secciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti CD11b hecho en rata (1:500, Serotec, Kidlington, Oxford, UK) toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente fueron lavadas 2 veces en TBS-Tx 1% durante 15 minutos e incubadas durante 2 horas con un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (Jackson). Se lavaron luego sucesivamente en TBS-Tx 1%, TBS-Tx 0.1% y 2 veces en PB. Cada uno de estos lavados fue de 10 minutos. Se incubaron con el kit comercial del complejo de avidina-biotina durante 2 horas, se lavaron 2 veces con PB durante 15 minutos, se realizó el revelado de las secciones con la solución de DAB antes descripta y finalmente se lavaron 3 veces con PB durante 10 minutos antes de montarlas en portaobjetos.

#### II.6.2.3 Inmunohistoquímica anti c-fos

La inducción de c-fos ha sido implicada en diversos procesos como la diferenciación celular, la proliferación y la transducción de señales. A pesar de que no se conoce bien en detalle su función en cada zona, se sabe que es un gen temprano que se expresa cuando una neurona se activa. Para detectar esta proteína los pasos del protocolo llevado adelante fueron los mismos que para la proteína GFAP, a excepción del anticuerpo primario utilizado. En este caso se utilizó anti c-fos hecho en conejo y se usó en una dilución 1:5000 (Calbiochem, San Diego, CA-USA).

## II.7 Cuantificaciones

### *II.7.1 Estereología*

La cuantificación de la microglia (células CD11b positivas) fue realizada por medio de estereología sin desvío de manera ciega a los tratamientos. Se usó un microscopio Nikon Elipse E600 y una videocámara CX900 (MicroBrightField Inc., Willistone, VT-USA) y el software de análisis de imágenes Stereo Investigator (MicroBrightField Inc.). La estereología es un método que utiliza el muestreo sistemático y aleatorio. El método de fraccionamiento óptico (West et al., 1991) fue empleado para estimar el

número de células de la microglia en el cerebelo, en la corteza y en diferentes zonas del hipocampo. Las distintas zonas fueron delineadas con la función de trazado del software usando un objetivo de aumento 10x (0.4 NA), de acuerdo al atlas de cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2004). Una estimación preliminar de la población fue realizada a fin de determinar los parámetros a utilizar. Las células CD11b positivas fueron contadas sólo al entrar en foco en el marco de muestreo, usando una lente de inmersión de aumento 60X y manteniendo la regla de muestreo no sesgado (Howard y Reed, 2005). Los parámetros utilizados en cada caso para la cuantificación se muestran en la tabla II.2. El tamaño del cuerpo celular fue medido con la herramienta "Nucleator", provista por el mismo software. 5 rayos que parten de un punto central son usados para determinar el volumen del soma. Para el análisis, el número de células, el volumen del soma de las células y el volumen de la región del cerebro fueron tenidos en cuenta para cada animal y promediados por grupo.

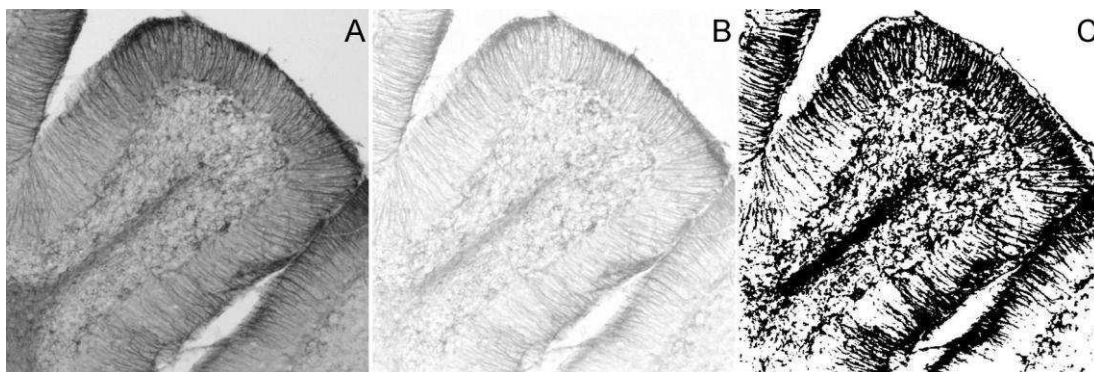
Parámetros	REGION						
	Cerebelo	CA1	Capa granular	Hilus	Capa Molecular	Corteza Motora	Corteza Somatosensorial
Marco de conteo	50x50 µm	70x70 µm	70x70 µm	70x70 µm	70x70 µm	70x70 µm	70x70 µm
Grilla	150x150 µm	200x200 µm	200x200 µm	200x200 µm	200x200 µm	200x200 µm	200x200 µm
Altura del marco de conteo	10 µm	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
Zonas excluidas	2 µm	2 µm	2 µm	2 µm	2 µm	2 µm	2 µm
CE (rango)	0.08-0.16	0.06-0.13	0.15-0.2	0.15-0.2	0.08-0.16	0.1-0.2	0.1-0.2
Mínima cantidad de objetos contados	38	58	24	24	36	11	7

**Tabla II.2.** Parámetros utilizados para la cuantificación de microglia con el software StereoInvestigator.

### II.7.2 Estimación del área GFAP-positiva

Luego de la inmunohistoquímica de GFAP, las secciones fueron analizadas con un microscopio Olympus (Center valley, PA-USA) y las imágenes digitales fueron obtenidas con una cámara Infinity2 y el software Infinity Capture (Lumenera Corporation, Ottawa, ON-Canadá). Diferentes regiones del cerebelo, la corteza y el hipocampo fueron identificadas para el análisis. El porcentaje de área inmunoreactiva para GFAP fue medida con

imágenes tomadas con el objetivo 10x y la ayuda del software ImageJ. Para esto, el umbral fue establecido manualmente de modo que todas las células inmuno-positivas fueran seleccionadas (figura II.6). Luego, el porcentaje de área ocupada por astrocitos fue calculado por el programa en cada región estudiada (Depino et al., 2011).



**Figura II.6. Cuantificación del porcentaje de área inmunoreactiva para GFAP.** En primer lugar se tomó una foto con el programa ImageCapture (A). Estas imágenes se abrieron en el programa ImageJ y se las procesó, substrayendo el fondo (B) y estableciendo un umbral de manera manual, de modo que todo lo que consideramos marca en la foto aparezca en la imagen procesada (C). A partir de esta nueva imagen, el programa puede calcular el porcentaje de área que tiene marca. En el ejemplo, se muestra el lobulillo 7 del cerebelo amplificado 100 veces.

### *II.7.3. Cuantificación de c-fos*

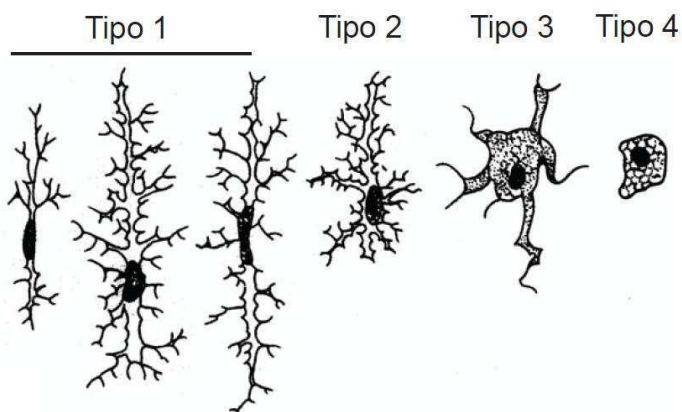
Luego de la inmunohistoquímica anti c-fos, se realizó una tinción clara con violeta de cresilo de modo de poder identificar mejor cada zona en los distintos cortes. Con ayuda del atlas de ratón, se localizó el núcleo del tracto solitario (NTS) y el núcleo parabraquial (PB) y se cuantificaron manualmente todas las células marcadas presentes en las estructuras de interés.

### *II.7.4 Análisis de la inflamación en el cerebelo*

A fin de evaluar el estado de inflamación luego de la inyección en el cerebelo, realizamos inmunohistoquímicas anti-CD11b y anti-GFAP en los cortes sagitales del cerebelo. En el caso del análisis de la microglia, pudimos ver que las células después de la operación presentaban distintos estadios morfológicos, por lo cual evaluamos la proporción de estos distintos

estadios adoptando la clasificación de activación de la microglia de Kreutzberg (Kreutzberg, 1996) (figura II.7): llamamos células en estadio 1 a aquellas células con procesos finos y ramificados; células en estadio 2/3 a aquellas con procesos largos o cortos pero gruesos, y célula en estadio 4 a aquellas con cuerpo celular redondo y citoplasma vacuolado, en las que no se pueden observar procesos en el microscopio óptico. La cuantificación se realizó en dos campos elegidos al azar a una magnificación 100X tanto para el lobulillo VI/VII como para el lobulillo IV/V.

Para el análisis de la astroglia, usamos el mismo método descrito en la sección anterior, cuantificando tanto en el lobulillo VI/VII como en el IV/V.



**Figura II.7. Estadios de activación de la microglia.** De izquierda a derecha, desde el estado de reposo o "vigilancia" al estado de máxima activación, en el cual la célula resulta indistinguible de un macrófago (Kreutzberg, 1996).

## II.8 Estadística

Se usaron distintas pruebas estadísticas según el caso, detallado en cada uno de los resultados. En términos generales se usaron, según correspondiese: pruebas de t pareadas o no pareadas, test de Mann-Whitney cuando los datos mostraban homocedacea pero no normalidad, test de t con corrección de Welch cuando los datos de dos poblaciones

mostraban normalidad pero no homocedacea, y ANOVA de uno o dos factores.

En los ensayos comportamentales en los que se evaluaban muchas variables se realizó un análisis de correlación usando el coeficiente de Pearson, a fin de eliminar las variables redundantes. Se consideró correlación entre dos variables cuando  $|r| \geq 0.70$ . Las variables que no correlacionaban se evaluaron en conjunto mediante un análisis multivariado de la varianza (MANOVA), que, además de identificar si los cambios en las variables independientes tienen efectos significativos en las variables dependientes, intenta identificar las interacciones entre las variables independientes y su grado de asociación con las variables dependientes de manera global. Posteriormente se realizaron ANOVAs de dos factores para cada una de las variables independientes. Las comparaciones realizadas luego de los ANOVA cuando el valor p fue menor o igual a 0.05, fueron llevadas adelante con la prueba de Tukey.

En todos los casos se evaluó que se cumplieran los supuestos de cada uno de los análisis. Se evaluó normalidad con la prueba de Kolmorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett.

Los datos fueron analizados con la ayuda del paquete estadístico Statistica, version 99, StatSoft.

## Capítulo III-Resultados

---

Caracterización conductual del modelo VPA.



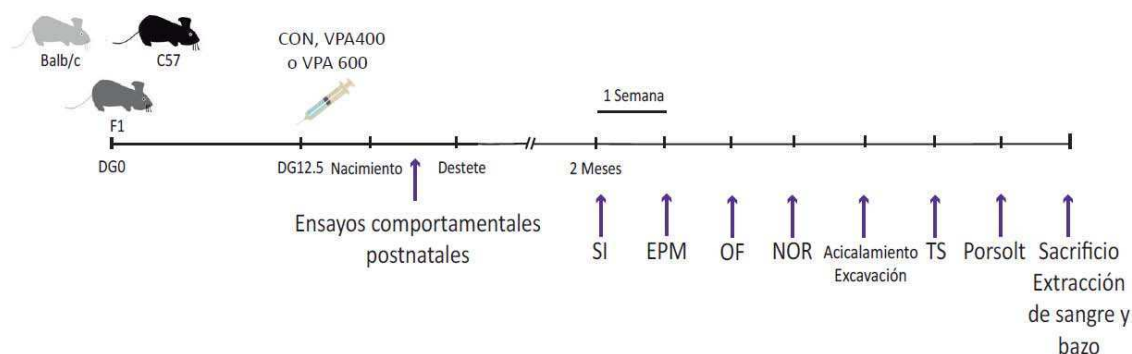
### III.1 Punto de inicio

Existen distintos grupos que emplean la exposición de animales al VPA, tanto prenatal como postnatalmente, como un modelo de autismo con causa ambiental. La principal característica que hace que los animales expuestos al VPA sean considerados un modelo de DEA es la disminución en la interacción social. Esta disminución le confiere al modelo validez aparente, ya que los animales tratados presentan características conductuales similares a las observadas en los humanos. Asimismo, el modelo presenta validez de constructo, ya que la población humana que ha sido expuesta al VPA prenatalmente ha mostrado una alta prevalencia de "síndrome de valproato fetal", síndrome que muestra similitudes fenotípicas con el autismo (Moore et al., 2000; Williams et al., 2001).

Al investigar la patofisiología de cierto desorden mediante el uso de modelos animales, no es un requisito la presencia de síntomas relacionados, pero en el caso de estar presentes, hacen al modelo más sólido y confiable. Fue por eso que decidimos analizar también los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión.

El objetivo de este capítulo fue caracterizar el comportamiento del modelo de VPA en ratones F1 (C57xBALB/c), evaluando particularmente comportamientos relacionados con el autismo, la ansiedad y la depresión.

## III.2 Diseño experimental



**Figura III.1. Diseño experimental usado en este capítulo.** F1 generada a partir de machos C57 y hembras BALB/c. Inyección de las madres preñadas el DG12.5. Las crías fueron sexadas el día postnatal 3, los machos fueron identificados por medio de una marca en uno de los dedos de las patas. Se controló el peso y la aparición de marcadores de desarrollo. Los ensayos comportamentales postnatales comprendieron la evaluación del reflejo de enderezamiento sobre una superficie, la fuerza de agarre y el ensayo de campo abierto. Al alcanzar la adultez, se realizó una serie de ensayos comportamentales. Al momento del sacrificio, un grupo de animales fue anestesiado y se les extrajo la sangre, el bazo y se disectó el cerebro. DG0: día gestacional 0. SI: ensayo de interacción social. EPM: laberinto elevado en cruz. OF: ensayo de campo abierto. NOR: ensayo de reconocimiento de objeto nuevo. TS: ensayo de suspensión por la cola. Las siglas se basan en los nombres de los ensayos en inglés.

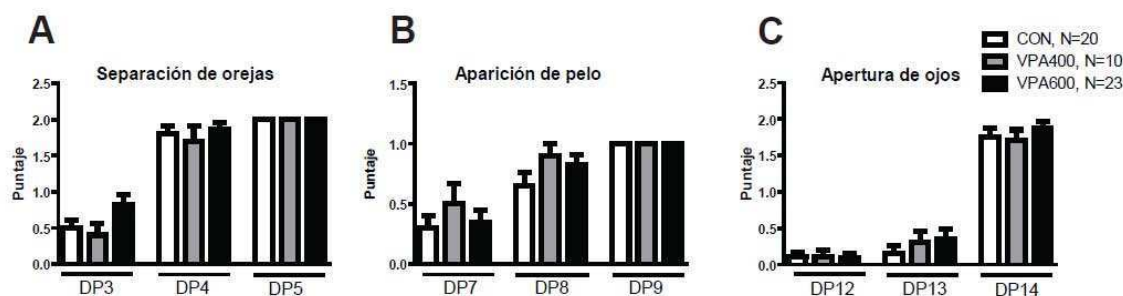
El diseño experimental utilizado es el que se muestra en la figura III.1. Decidimos usar una F1 generada como se indica en Materiales y Métodos debido a que contábamos con las cepas BALB/c y C57 y que nuestra experiencia previa en comportamiento y apareos con esas cepas indicaba que ninguna de las dos resultaba favorable para este diseño: los BALB/c eran muy pasivos comportamentalmente por lo que creímos que resultaría difícil ver una disminución en el comportamiento social, y las hembras C57 se comían con alta frecuencia a sus crías. En ese contexto, el uso de una F1 entre ambas cepas resultó conveniente, ya que los animales resultantes de este apareo son más activos y las madres BALB/c se comen con menor frecuencia a su camada. Consideramos el DG0.5 como el día en el que se observa en la hembra tapón vaginal e inyectamos VPA al DG12.5 basándonos en trabajos de otros laboratorios (Schneider y Przewlocki, 2005; Wagner et al., 2006; Kim et al., 2011). El DP0 fue el día en el que observamos a la camada con la madre antes de las 14 hs.

### III.3 Desarrollo de las crías

Debido a que el VPA es un agente teratogénico (Faiella et al., 2000), los animales expuestos a esta droga podrían sufrir problemas en el transcurso de la preñez o durante el desarrollo.

Con respecto a la preñez, la droga no mostró ningún efecto en el transcurso de esta: no observamos diferencias en el número de crías por ratón o en la duración de la preñez, independientemente del tratamiento asignado.

Con respecto al desarrollo de las crías, a fin de evaluar si la droga tenía algún efecto estudiamos tres marcadores neonatales de desarrollo: separación de orejas, aparición de pelo y apertura de ojos. Estos sucesos se dan en días determinados del desarrollo del ratón, por lo que se espera que se mantengan constantes entre los distintos grupos si el VPA no está afectando el desarrollo normal de las crías. No encontramos diferencias entre los 3 grupos experimentales en la aparición de estos marcadores (figura III.2). También fue estudiada la ganancia de peso entre el DP4 y el DP14, como un parámetro del crecimiento. Para analizar esto hicimos un ANOVA de medidas repetidas. Observamos una interacción significativa entre tiempo y tratamiento (efecto de la interacción:  $F_{(20,520)}=4.520$ ,  $p=0.001$ ), por lo que evaluamos el efecto del tratamiento día por día y no observamos diferencia en ninguno de los días analizados.



**Figura III.2: Efecto del VPA prenatal sobre el desarrollo.** Se evaluó el desarrollo normal de los animales observando marcadores típicos. No se observaron diferencias entre los tres grupos en la separación de orejas (A), aparición de pelo (B) o apertura de ojos (C). N, en el gráfico. ANOVA de 1 factor. Se grafica la media  $\pm$  EE.

Todos estos resultados en conjunto muestran que la exposición prenatal a las dosis utilizadas de VPA no tiene efectos deletéreos generales sobre el desarrollo.

#### III.4 Comportamiento de las crías

Evaluamos comportamientos que maduran en días predecibles y que dependen de las regiones del cerebro relevantes para el autismo (el hipocampo, la corteza y el cerebelo): el enderezamiento sobre superficie entre el DP4 y el DP8, y la fuerza de agarre a una grilla colgante entre DP13 y DP18. También evaluamos la actividad motora en un campo abierto a DP14, DP21 y DP28.

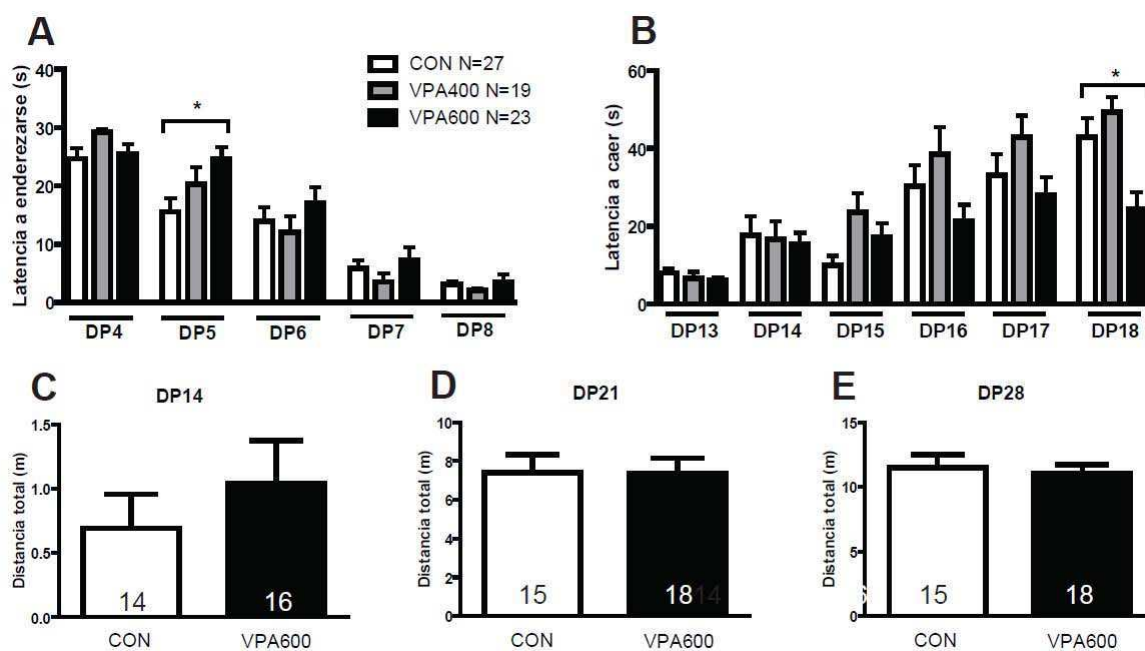
##### *III.4.1 Enderezamiento sobre una superficie*

Al colocar un ratón en decúbito dorsal sobre una superficie, éste girará sobre sí mismo para lograr posicionarse sobre sus 4 patas. Esta habilidad de girar es adquirida durante el desarrollo postnatal y constituye un acto reflejo, denominado reflejo de enderezamiento. De manera de examinar la aparición de dicho reflejo se realizó el ensayo de enderezamiento sobre superficie diariamente entre el DP4 y el DP8.

El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de medidas repetidas. Observamos que la adquisición del reflejo de enderezamiento sobre una superficie depende del tratamiento prenatal recibido (ANOVA de medidas repetidas, interacción tiempo x tratamiento prenatal:  $F_{(8,228)}=2.051$  ;  $p=0.048$ ). El efecto del tratamiento con VPA se evidencia el DP5 ( $F_{(2,57)}=3.505$  ;  $p=0.037$ ), día en el que vemos que los animales VPA600 muestran una mayor latencia a enderezarse (figura III.3-A). Esta diferencia observada al DP5 desaparece los días siguientes, indicando que el efecto de VPA consistiría en retrasar la aparición del reflejo estudiado.

### III.4.2 Fuerza de agarre

A fin de estimar el efecto del tratamiento prenatal sobre la fuerza de los miembros de los animales, realizamos el ensayo de fuerza de agarre. Éste consiste simplemente en someter a los animales a una situación en la que se deben mantener agarrados evitando una caída. Se realizó evaluando la capacidad de sostenerse de una reja entre el DP13 y el DP18. Observamos una interacción significativa entre tiempo y tratamiento (efecto de la interacción:  $F_{(10,225)}=2.428$  ;  $p= 0.011$ ). Los tres grupos mostraron un aumento en la latencia a caer desde la red a lo largo de los días evaluados, pero este aumento fue menor en los animales expuestos a VPA600, de modo que en el DP18 la latencia resultó significativamente menor a la de los animales control ( $F_{(2,45)}=7.405$  ;  $p= 0.002$ ) (figura III.3-B).



**Figura III.3. Efecto del VPA prenatal sobre el comportamiento de las crías. A.** Latencia a girar en el ensayo de enderezamiento sobre superficie: los ratones VPA600 mostraron una mayor latencia en el DP5. **B.** Latencia a caer desde una red colgante: los ratones VPA600 mostraron una menor latencia que es significativa en el DP18. **C-E** Distancia total recorrida en un ensayo de campo abierto al DP14, DP21 y DP28: los animales no mostraron diferencias a ninguna de las edades evaluadas en los niveles de exploración. N, se muestra en el gráfico o en cada barra. ANOVA de medidas repetidas, seguido de prueba de Tukey en **A** y **B**, \* $p<0.05$ . Prueba de Mann-Whitney en **C**, prueba de t no pareada en **D** y **E**. Se grafica la media  $\pm$  EE.

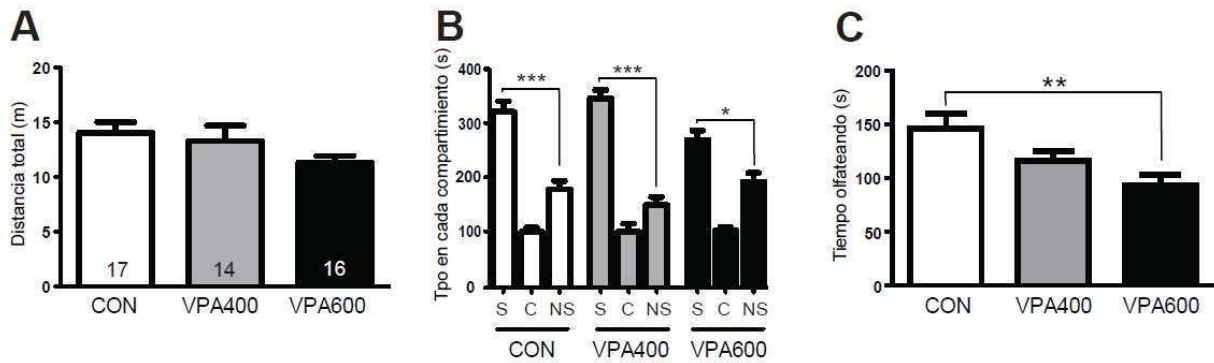
### *III.4.3 Locomoción en un ambiente novedoso*

Como parte de la caracterización del desarrollo de los animales, evaluamos los niveles de locomoción en el DP14, el DP21 y el DP28. Lo realizamos por medio de un ensayo de campo abierto de menores dimensiones a fin de favorecer la locomoción de las crías, ya que un campo abierto muy grande aumentaría los niveles de ansiedad o miedo en los animales y podría generar el comportamiento de *freezing* o inmovilidad. En ninguna de las tres edades observamos diferencias en la locomoción entre los 3 grupos (DP14,  $U=94$ ,  $p=0.467$ ; DP21,  $t_{(36)}=0.059$ ;  $p=0.953$ ; DP28,  $t_{(36)}=0.365$ ;  $p=0.718$ ) (figura III.3-C, D y E).

## III.5 Comportamiento de adultos

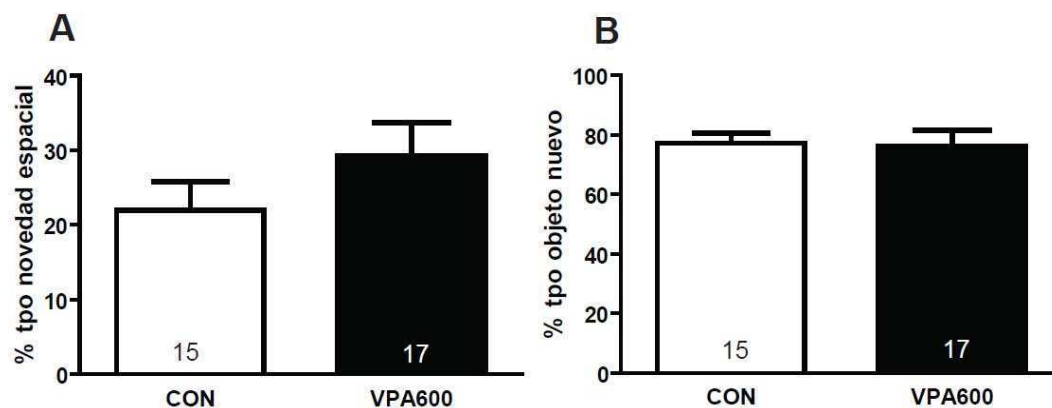
### *III.5.1 Interacción social*

Como mencionamos anteriormente, una de las principales características del DEA es el déficit en la interacción social. Por esta razón, el ensayo de interacción social (SI) fue el primero llevado adelante, de forma de asegurarnos que el comportamiento no es afectado por exposición previa a otros ensayos. En primer lugar comparamos los niveles de exploración en las dos fases. Todos los grupos mostraron niveles similares de locomoción tanto en la fase de habituación ( $F_{(2,44)}=2.498$ ;  $p=0.094$ ) como en la de interacción social ( $F_{(2,44)}=2.011$ ;  $p=0.146$ ) (figura III.4-A). Observamos que los 3 grupos de animales prefieren pasar más tiempo en el lado social, aunque esta preferencia parece ser menor en el grupo de animales VPA600 (figura III.4-B). Cuando analizamos el tiempo que los animales pasan explorando activamente al ratón estímulo, vemos un claro efecto del tratamiento prenatal ( $F_{(2,44)}=5.447$ ;  $p=0.007$ ): los animales del grupo VPA600 pasan menos tiempo involucrados en la tarea de interacción social (figura III.4-C).



**Figura III.4. Efecto del VPA prenatal sobre la interacción social.** Los 3 grupos de animales mostraron similares niveles de exploración durante el ensayo de interacción social (A), pero los ratones VPA600 mostraron una reducción en la preferencia por el lado social (B) y pasaron menos tiempo oliendo al ratón estímulo (C). N, se muestra en cada barra. Prueba de Tukey: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. Se grafica la media ± EE. S, lado social; C, centro, NS, lado no social.

La disminución en la exploración del estímulo social podría deberse a una neofobia general, relacionada con el componente novedoso del estímulo en lugar de con el componente social. Para disociar estos dos componentes, y poder así distinguir a cuál de los dos corresponde el resultado de este ensayo, realizamos el ensayo de reconocimiento de objeto nuevo. El paradigma que utilizamos nos permite evaluar la exploración de un objeto desplazado (novedad especial) y de un objeto nuevo (novedad de objeto) de cada animal. No encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos en el tiempo que los animales pasan evaluando el objeto desplazado ( $t_{(30)}=1.234$ ;  $p=0.227$ ) (figura III.5, A), o el objeto nuevo ( $t_{(30)}=0.155$ ;  $p=0.878$ ) (figura III.5, B), por lo que descartamos la idea de que el efecto observado en el SI se debe a una disminución general en la respuesta a la novedad.

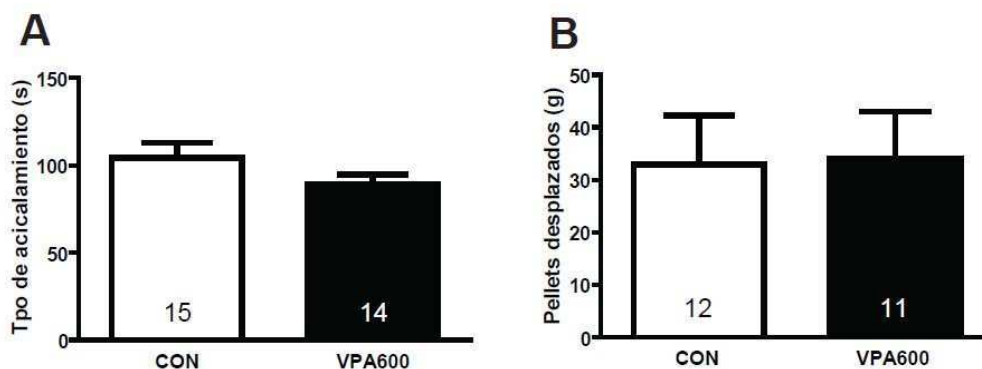


**Figura III.5. Efecto del VPA prenatal sobre el comportamiento ante una novedad espacial o de objeto.** Los animales VPA600 no mostraron diferencia en el porcentaje de tiempo que pasan explorando la novedad espacial (**A**) o en el porcentaje de tiempo que pasan evaluando un objeto nuevo (**B**). N, se muestra en cada barra. Prueba de t no pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE.

El acicalamiento es un comportamiento que ocurre naturalmente, de manera espontánea y que implica una serie de movimientos repetitivos. Para evaluar este comportamiento, los animales son colocados en unos tubos en los que no pueden hacer un despliegue comportamental muy variado, lo que aumenta la probabilidad de observarlos acicalándose. No observamos diferencias entre ambos grupos en el tiempo que dedican a acicalarse ( $t_{(27)} = 1.494$ ,  $p = 0.147$ ) (figura III.6-A).

Por otra parte, el ensayo de excavación se basa en una tendencia natural de los roedores de llevar adelante este comportamiento sobre distintos substratos, que implica movimientos estereotipados. Este comportamiento estaría relacionado con sus ancestros que vivían salvajemente (obviamente, fuera de los bioterios), donde debían cavar para buscar granos, semillas, insectos o para hacer nidos o madrigueras. Utilizando un ensayo descrito previamente, vimos que los ratones VPA600 no mostraron diferencias en la cantidad de pellets desplazados con respecto a los ratones CON ( $U = 56$ ,  $p = 0.559$ ) (figura III.6-B), lo que sugiere que pasaron la misma cantidad de tiempo realizando los movimientos estereotipados que implica este comportamiento.





**Figura III.6. Efecto del VPA prenatal sobre los comportamientos repetitivos.** **A.** Los animales VPA600 no muestran diferencias en el tiempo que pasan acicalándose. **B.** Tampoco muestran diferencia en la cantidad de pellets desplazados en el ensayo de excavación. N, se muestra en cada barra. Prueba de t no pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE.

### *III.5.3 Síntomas relacionados: Comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión en el modelo de VPA*

Los trastornos de ansiedad y la depresión presentan una alta comorbilidad con el autismo (American Psychiatric Association, 2000) aunque, como mencionamos en la introducción, se discute si constituyen comportamientos asociados o co-ocurrentes (Hofvander et al., 2009). Decidimos evaluar tanto el comportamiento relacionado con la ansiedad como el relacionado con la depresión, ampliando así la caracterización comportamental del modelo.

Para evaluar el comportamiento relacionado con la ansiedad realizamos el ensayo de laberinto elevado en cruz y el ensayo de campo abierto (EPM y OF respectivamente, por sus iniciales en inglés). Ambos ensayos han sido validados de manera farmacológica, mostrando su valor predictivo para drogas ansiolíticas (Walsh y Cummins, 1976; Crawley, 1981; Pellow et al., 1985; Costall et al., 1989; Hogg, 1996). En ambos ensayos se miden muchas variables y muchas veces se reporta el análisis de cada una por separado. El inconveniente de realizar este tipo de análisis es que se aumenta mucho el error de tipo I, es decir, rechazar una hipótesis cuando ésta es verdadera. Como las variables en cuestión están relacionadas, un acercamiento estadístico que contempla esta relación es el análisis multivariado de la varianza (MANOVA) que contrasta diferencias

entre las medias de dos o más variables dependientes simultáneamente. Sin embargo, si en el MANOVA se incluyen variables con alta correlación, corremos el riesgo de cometer un error de tipo II, es decir, aceptar una hipótesis cuando esta es falsa. Para evitar esto, tomamos la decisión de descartar del análisis aquellas variables con alto grado de correlación, para lo cual realizamos un análisis de correlación de Pearson y descartamos aquellas cuyo  $|r| \geq 0.7$ .

<i>Variables</i>	
<i>Laberinto elevado en cruz (EPM)</i>	<i>Campo abierto (OF)</i>
<b>Distancia total EPM</b>	<b>Distancia total OF</b>
Tiempo de exploraciones EPM	<b>Eventos de acicalamiento OF</b>
<b>Exploraciones verticales EPM</b>	<b>Tiempo de acicalamiento OF</b>
<b>Tiempo en el centro EPM</b>	<b>Exploraciones verticales OF</b>
Distancia en el centro EPM	Tiempo de exploraciones OF
Tiempo en extremos EPM	Entradas al centro OF
Distancia en extremos EPM	Tiempo en el centro OF
Tpo en brazos abiertos time EPM	Distancia en el centro OF
Distancia en brazos abiertos EPM	Latencia al centro OF
<b>% distancia en brazos abiertos EPM</b>	Tiempo en periferia
Tiempo en brazos cerrados EPM	Distancia en periferia
Distancia en brazos cerrados EPM	<b>% distancia en el centro</b>
<b>Tiempo de acicalamiento EPM</b>	
Eventos de acicalamiento EPM	

**Tabla III.1.** Variables cuantificadas en los ensayos de laberinto elevado en cruz (EPM) y campo abierto (OF). En negrita se muestran las variables que fueron incorporadas al MANOVA

Luego de aplicar el criterio mencionado, las variables finalmente incluidas en el MANOVA fueron: distancia total, número de exploraciones verticales, tiempo en el centro, porcentaje de distancia en los brazos abiertos y tiempo de acicalamiento para el EPM; y distancia total, eventos de acicalamiento, tiempo de acicalamiento, número de exploraciones verticales y porcentaje de distancia en el centro para el OF (tabla III.1).

En ambos casos, el MANOVA mostró un efecto del tratamiento prenatal (EPM:  $\lambda = 0.467$ ,  $F_{(10,78)} = 3.614$ ,  $p = 0.001$ ; OF:  $\lambda = 0.608$ ,  $F_{(10,92)} = 2.598$ ,  $p = 0.008$ ), evidenciando que la exposición a VPA modifica las variables

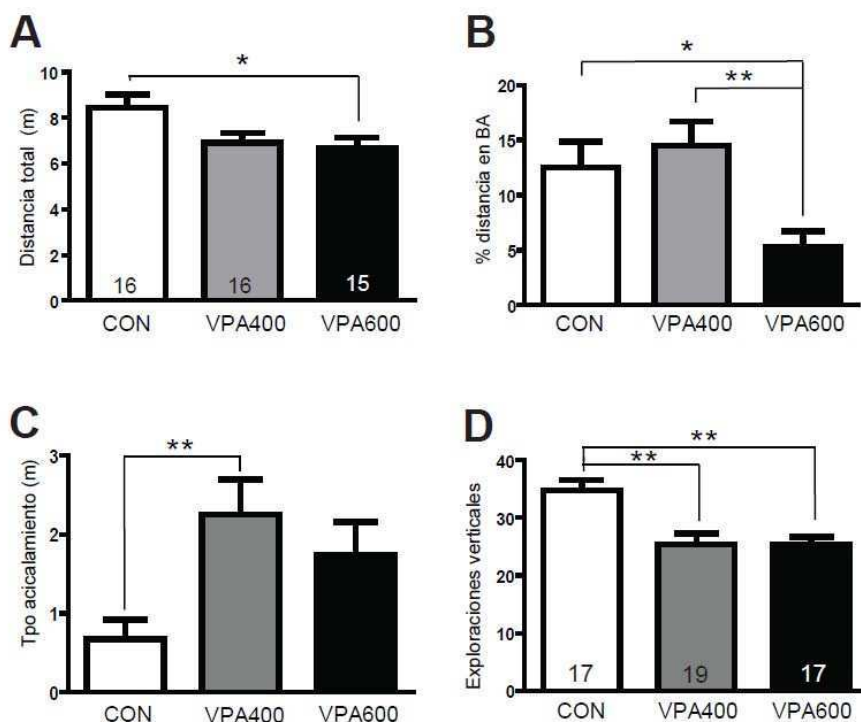
estudiadas de forma conjunta, afectando el comportamiento relacionado con la ansiedad.

En base al resultado anterior decidimos mirar variable por variable y ver cuáles eran las más afectadas. El resultado del ANOVA para cada variable se muestra en la tabla III.2. Los resultados más relevantes fueron una disminución en la exploración total del EPM (figura III.7-A) y una disminución en el porcentaje de distancia recorrida en los brazos abiertos del EPM por los animales VPA600 (figura III.7-B), junto a un aumento en el tiempo de acicalamiento de los animales expuestos a VPA, que alcanza una diferencia significativa en los animales VPA400 (figura III.7-C). También se observó una disminución en la cantidad de exploraciones verticales en el OF en los animales expuestos al VPA (figura III.7-D). Estos datos en conjunto nos muestran un aumento en el comportamiento relacionado con la ansiedad en los animales expuestos prenatalmente al VPA.

<i>Variables del EPM</i>		
<b>Distancia total EPM*</b>	<b><math>F_{2,43}</math>: 3.795</b>	<b><math>p</math>: 0.030</b>
Exploraciones verticales EPM	$F_{2,43}$ : 2.666	$p$ : 0.081
Tiempo en el centro EPM	$F_{2,43}$ : 2.155	$p$ : 0.128
<b>% distancia en brazos abiertos EPM*</b>	<b><math>F_{2,43}</math>: 5.795</b>	<b><math>p</math>: 0.006</b>
<b>Tiempo de acicalamiento EPM*</b>	<b><math>K</math>: 8.523</b>	<b><math>p</math>: 0.014</b>

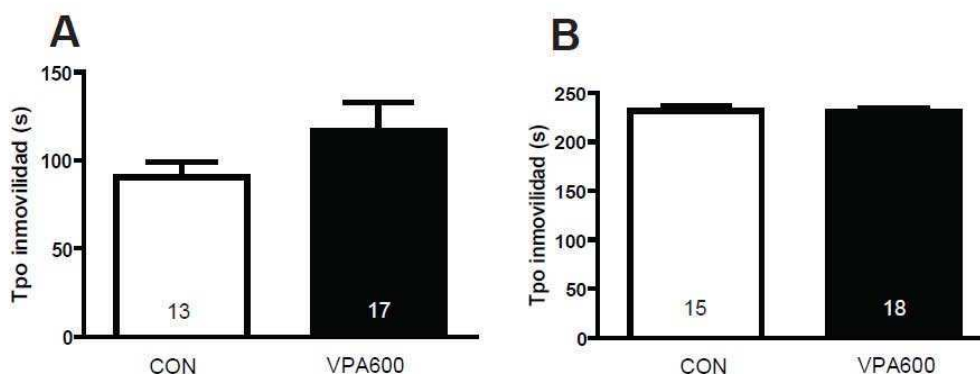
<i>Variables del OF</i>		
Distancia total OF	$F_{2,50}$ : 1.719	$p$ : 0.189
Eventos de acicalamiento OF	$F_{2,50}$ : 0.924	$p$ : 0.403
Tiempo de acicalamiento OF	$F_{2,50}$ : 0.995	$p$ : 0.377
<b>Exploraciones verticales OF*</b>	<b><math>F_{2,50}</math>: 9.845</b>	<b><math>p</math>: 0.001</b>
% distancia en el centro OF	$F_{2,50}$ : 0.230	$p$ : 0.795

**Tabla III.2. ANOVA de las variables incluidas en los MANOVAs de los ensayos de EPM y de OF.** En negrita se muestran las variables en las que observamos diferencias significativas.



**Figure III.7. Efecto del VPA prenatal sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad.** Los animales VPA600 exploran menos en el EPM (**A**) pero el porcentaje de distancia que recorren en los brazos abiertos también es menor (**B**). Animales expuestos a VPA muestran mayores niveles de acicalamiento en el EPM, siendo significativamente mayor el tiempo de acicalamiento de los animales VPA400 (**C**). Además muestran menos eventos de exploración vertical en el OF (**D**). N, se muestra en cada barra. Prueba de Tukey para A, B y D; Kruskal Wallis para C: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se grafica la media  $\pm$  EE.

El ensayo de suspensión por la cola y el de natación forzada (ensayo de Porsolt) fueron usados para evaluar el comportamiento relacionado con la depresión. El tiempo de inmovilidad en ambos ensayos disminuye cuando se usan drogas antidepresivas (Cryan et al., 2005), por lo que se interpreta un aumento en estos tiempos como comportamientos relacionados con la depresión. No observamos diferencias significativas entre el grupo CON y el grupo VPA600 en ninguno de los dos casos, lo que muestra similares niveles de comportamiento relacionado con la depresión en ambos grupos (figura III.8).



**Figura III.8. Efecto del VPA prenatal sobre el comportamiento relacionado con la depresión.** Los animales VPA600 no muestran diferencia en el tiempo que pasan inmóviles en el ensayo de suspensión por la cola (**A**) o en el ensayo de natación forzada (**B**). N, se muestra en cada barra. Prueba de t no pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE.

### III.6 ¿VPA como estímulo inflamatorio?

Los resultados observados hasta este momento resultaban sorprendentemente similares a los observados en trabajos en los que utilizan una activación inflamatoria materna como herramienta para generar un modelo de autismo. Por ejemplo, la infusión intranasal del virus humano de influenza en el DG9.5 resulta en una disminución de la sociabilidad en ratones (Shi et al., 2003). Además, la inyección intraperitoneal de poli:I:C en el DG12.5 resulta en un aumento en el comportamiento relacionado con la ansiedad y también en una disminución en la sociabilidad en el ratón (Smith et al., 2007).

Debido a la similitud observada, decidimos evaluar si la inyección de VPA generaba una activación aguda del sistema inmune o del eje HPA. Como todo estímulo inflamatorio activa tanto al sistema inmune como al eje HPA, decidimos medir sólo una de esas dos variables y elegimos medir los niveles de corticosterona a las dos horas después de inyectar VPA o solución salina. La inyección fue realizada a ratonas BALB/c adultas, del mismo modo que se le realizó a las madres preñadas (Ver Materiales y Métodos, sección II.2.1), probando la dosis de VPA más alta utilizada (600 mg/kg). No observamos diferencias significativas en los niveles de corticosterona en

plasma (prueba de Mann-Whitney,  $U=6$ ;  $p=0.786$ ), por lo que descartamos que el VPA en sí mismo esté actuando como un estímulo inflamatorio y generando las alteraciones a largo plazo en la conducta de las crías mediante este mecanismo.

### III.7 Conclusiones

Debido a que el autismo es diagnosticado comportamentalmente en los humanos, la evaluación comportamental se convierte en un requisito prácticamente fundamental en el estudio de potenciales modelos animales. En este capítulo mostramos la validación comportamental del modelo de exposición prenatal a VPA en una F1 (BALB/c x C57).

Se ha visto que la preferencia por un estímulo social es una característica conservada entre las distintas cepas de ratones (Moy et al., 2007) y la F1 generada para esta tesis no constituye una excepción a esto. Debido a que la disminución en la interacción social es una de las características principales del DEA, fue lo primero a evaluar en este modelo y el resultado de esta evaluación mostró una efectiva disminución en este comportamiento por parte de los animales de la F1 expuestos al VPA. Además, observamos un efecto temprano de esta droga sobre el desarrollo, que se manifestó en el retraso que mostraron los animales VPA600 en la adquisición del reflejo de enderezamiento el DP5. Estos resultados están en consonancia con los resultados obtenidos por otros grupos (Schneider y Przewlocki, 2005; Wagner et al., 2006; Gandal et al., 2010; Roullet et al., 2010; Kataoka et al., 2011).

Si bien el resultado de la disminución en la interacción social en el modelo de VPA no es un resultado novedoso en sí mismo, si lo es el hecho de haberlo validado por primera vez en una descendencia híbrida (C57 x BALB/c). Este trabajo, junto a los trabajos anteriormente mencionados y a resultados actuales del laboratorio en la cepa exocriada CF1, muestran que la reducción en la interacción social luego de la exposición prenatal al VPA

es un fenotipo robusto que no depende del contexto genético de los animales.

Con respecto al comportamiento repetitivo, otra de las características principales del autismo, no observamos diferencias entre los animales expuestos al VPA y los animales control. Si bien otros grupos de investigación informan haber visto un aumento, algunos evidencian este aumento por medio de otros ensayos u otros roedores como modelo (Schneider y Przewlocki, 2005; Schneider et al., 2008; Kataoka et al., 2011; Mehta et al., 2011; Zhang et al., 2012). Los grupos que trabajan en ratones y realizan el mismo ensayo que nosotros, lo hacen cuantificando el acicalamiento durante 10 minutos en una jaula (Gandal et al., 2010; Mehta et al., 2011), mientras que nosotros lo realizamos en un tubo que restringe bastante el movimiento de los animales. Realizamos esta variación en el ensayo debido a que cuando intentamos evaluar esto en la jaula, los ratones pasaban los 10 minutos llevando adelante otros comportamientos, como moverse, olfatear, explorar verticalmente, etc, y no lográbamos verlos acicalándose (Depino et al., 2011). Las diferencias podrían no existir, o bien podría ser que con nuestro diseño no logramos la sensibilidad que el ensayo requiere para poder ver esas diferencias. Para distinguir entre estas dos opciones, realizamos un ensayo de excavación, y tampoco observamos diferencias en el comportamiento repetitivo, lo que refuerza la conclusión de que en este contexto genético no existe tal aumento.

Por otra parte, extendimos la previa caracterización del modelo al evaluar el comportamiento relacionado con la ansiedad y con la depresión. Los animales expuestos a VPA mostraron un comportamiento relacionado con la ansiedad tanto al evaluar los ensayos de EPM y de OF de manera global, considerando todas las variables (MANOVA), como al evaluar las variables utilizadas clásicamente para detectar comportamientos relacionados con la ansiedad. Los ratones VPA600 exploraron menos los brazos abiertos del EPM, de acuerdo con los reportes previos en ratones CD1 (Kataoka et al., 2011) y ratas Wistar (Schneider et al., 2008). En el OF, los ratones VPA600 mostraron menor exploración pero no un comportamiento relacionado a la ansiedad clásico (por ejemplo, la reducción

en el tiempo que pasan en el centro o en las entradas al centro), un comportamiento que sí fue observado en ratones CD1 expuestos a VPA (Kataoka et al., 2011, 2012). Estas diferencias podrían deberse a diferencias técnicas (por ejemplo el tiempo entre los ensayos fue solo de 1 día en los experimentos reportados por Kataoka, por lo que el haber estado expuesto al EPM podría aumentar los niveles de ansiedad al día siguiente en el OF, mientras que nosotros dejamos pasar una semana para minimizar el efecto que puede tener un ensayo sobre el siguiente) o bien podría deberse a diferencias entre las cepas.

Con respecto al comportamiento relacionado a la depresión, hasta donde sabemos, este es el primer reporte sobre la desesperanza (uno de las componentes de la depresión, junto a la anhedonia) en el modelo de exposición prenatal al VPA. No encontramos diferencias entre los ratones VPA y CON en las pruebas de suspensión por la cola y natación forzada.

Llamativamente, en el laboratorio, el licenciado Campolongo, usando este mismo modelo pero en la cepa exocriada CF1 observó un resultado contrario: los animales expuestos a VPA no mostraron comportamientos relacionados con la ansiedad pero sí con la depresión (datos aún no publicados). Sabemos que los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión son de por sí altamente dependientes de la cepa en la que son evaluados (Griebel et al., 2000). Esta dependencia del contexto genético podría explicar la diferencia en el efecto que tiene el VPA sobre estos comportamientos en los distintos trabajos en los que lo evalúan. La variabilidad en cuanto a la expresión de comportamientos relacionados con la ansiedad o con la depresión que se observa en el modelo de VPA generado en distintos contextos genéticos se encuentra en línea con lo que se observa en las personas con DEA: no son déficits principales o que se presenten en todos los casos y, en el caso de manifestarse, no ocurren necesariamente juntos. En particular, como mencionamos en la introducción, la ansiedad es una de las alteraciones más comunes, sobre todo entre los niños y en los adolescentes con DEA (Ghaziuddin et al., 2002) y ese es el comportamiento que observamos en esta tesis.



Los resultados obtenidos, puestos en el contexto de otros trabajos, nos lleva a concluir que el modelo de exposición a VPA tiene validez aparente, ya que recapitula no solo las características principales del desorden, sino también algunos síntomas asociados. También podemos afirmar que tiene validez de constructo; esta validez viene dada por el diseño experimental usado, ya que el agente que genera el modelo es el mismo que lo genera en la población humana. Por último, recientes trabajos muestran que el modelo también tiene validez predictiva (Schneider et al., 2006; Woo y Leon, 2013): Schneider mostró en un trabajo que el enriquecimiento ambiental, incluyendo estimulación sensorial, revierte la mayoría de las alteraciones observadas en las crías expuestas al VPA prenatalmente (Schneider et al., 2006), mientras que Woo y Leon recientemente realizaron un ensayo clínico en el que exponían a los niños a ambientes enriquecidos con estímulos sensoriales y observaron que los niños con DEA expuestos a este enriquecimiento tuvieron una mejoría en algunos de los síntomas manifestados (Woo y Leon, 2013).

Si consideramos que la hipótesis propuesta es que los procesos inflamatorios subyacen el desarrollo de los comportamientos autistas, los resultados obtenidos con este modelo nos permiten seguir adelante en la puesta a prueba de esta hipótesis, en búsqueda de alteraciones del sistema inmune innato y su relación con los síntomas aquí observados.

## Capítulo IV-Resultados

---

Alteraciones periféricas y centrales en la respuesta inflamatoria en el modelo VPA.

## IV.1 Punto de inicio

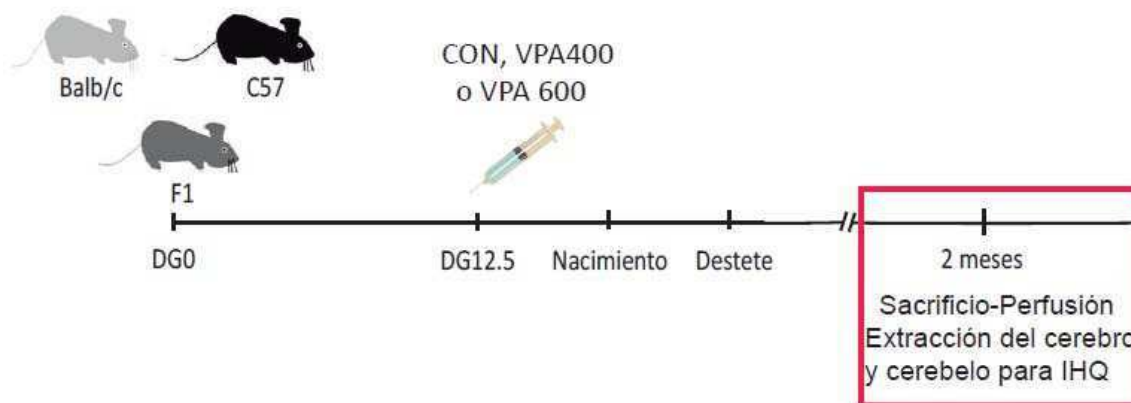
En la introducción mencionamos trabajos que muestran la ocurrencia frecuente de enfermedades crónicas inflamatorias y de respuestas anormales ante infecciones por parte de las células sanguíneas de personas con DEA (Jyonouchi et al., 2001; Parracho et al., 2005; Hornig et al., 2008; Malik et al., 2011; Wang et al., 2011).

La pregunta que surge inmediatamente es ¿cuál es el rol que está jugando el sistema inmune y cuán importante resulta? Las alteraciones del sistema inmune que se observan en la periferia, ¿tienen un correlato en el sistema nervioso central? Algunos estudios muestran la presencia de glia activada, neuroinflamación y expresión de citoquinas en el cerebro de pacientes con autismo (Pardo et al., 2005; Vargas et al., 2005; Casanova, 2007). El significado de estas observaciones no queda claro aún, pero sugiere una importante contribución de las células responsables de la inmunidad en el sistema nervioso central a este desorden del neurodesarrollo.

El objetivo de este capítulo, por lo tanto, fue estudiar la ocurrencia en el modelo de VPA de alteraciones basales en el sistema inmune innato y en la respuesta inflamatoria, tanto a nivel periférico como central.

## IV.2 Diseño Experimental

Para alcanzar el objetivo planteado, a los animales utilizados en el capítulo anterior los sacrificamos y les extrajimos sangre, bazo, cerebelo, hipocampo y corteza, a fin de conocer los niveles de corticosterona y el perfil de expresión de citoquinas (figura III.1). Además, usamos una nueva cohorte de animales (figura IV.1) que perfundimos al alcanzar los 2 meses de edad y en los cuales estudiamos el estado de activación de la astrogliya y de la microglia en las mismas 3 zonas del cerebro.



**Figura IV.1: Diseño experimental usado en este capítulo.** F1 generada como en el capítulo anterior. Inyección el DG12.5. Destete y crecimiento hasta los 2 meses. Al momento del sacrificio se anestesió a los animales y se los perfundi, extrayendo cerebelo y cerebro que luego fueron usados para histología. DG0: día gestacional 0. DG12.5: día gestacional 12.5. IHQ: inmunohistoquímicas.

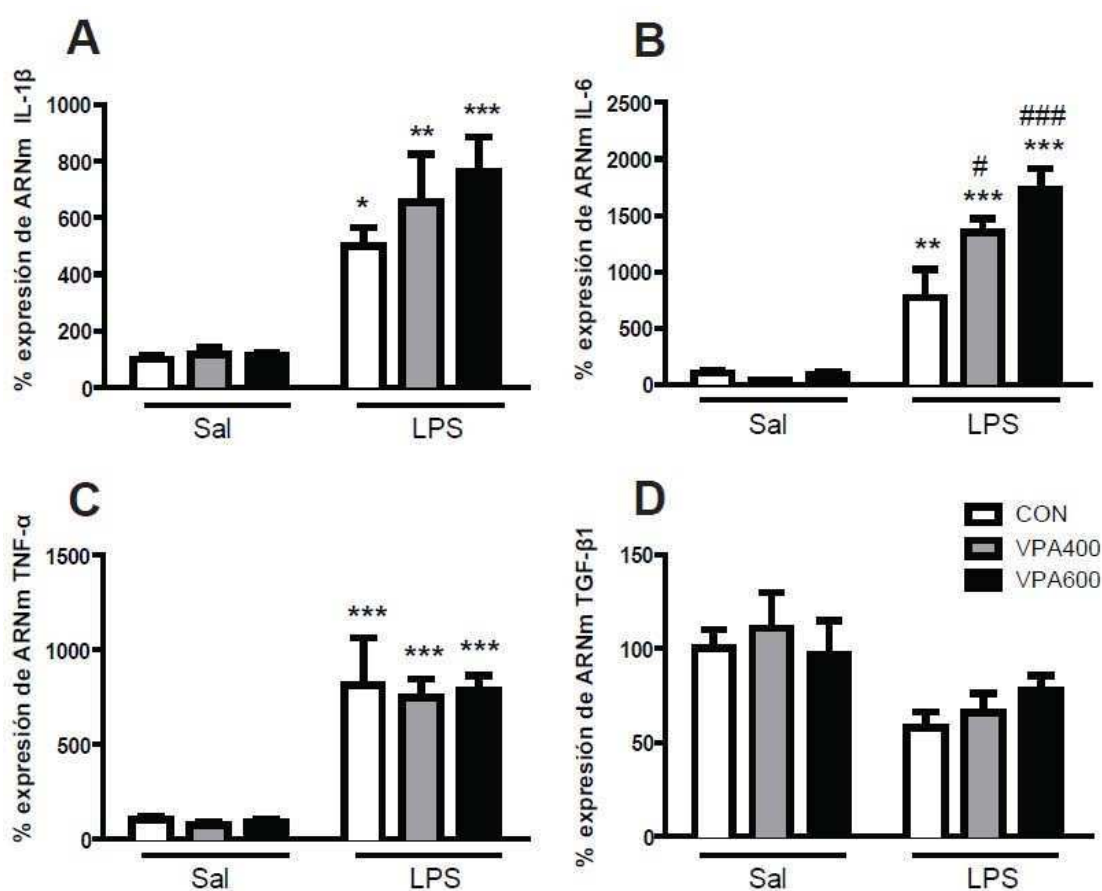
### IV.3 Efecto de un estímulo inflamatorio en la periferia

#### IV.3.1 Sobre el perfil de expresión de citoquinas

Existen varios trabajos en los que se estudia el patrón de expresión de citoquinas en el suero o plasma de pacientes con DEA (Singh, 1996; Singh et al., 1998; Singh et al., 2002; Sweeten y Fujinami, 2004; Zimmerman et al., 2005; Okada et al., 2007; Ashwood et al., 2008; Enstrom et al., 2010), y tres de estos en particular han evaluado si los niveles de citoquinas están asociados con el comportamiento (Okada et al., 2007; Ashwood et al., 2008; Enstrom et al., 2010).

Con esto en mente, decidimos evaluar en nuestro modelo tanto los niveles basales de distintas citoquinas como la respuesta a un estímulo inflamatorio. Para esto, inyectamos lipopolisacárido bacteriano (LPS) o solución salina (SAL) a los animales adultos de nuestros tres grupos experimentales, generando así 6 grupos: CON-Sal, VPA400-Sal, VPA600-Sal, CON-LPS, VPA400-LPS y VPA600-LPS. El LPS es un conocido inflamógeno que constituye la mayor porción de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Su inyección en los mamíferos induce la liberación de citoquinas proinflamatorias y activa al eje HPA.

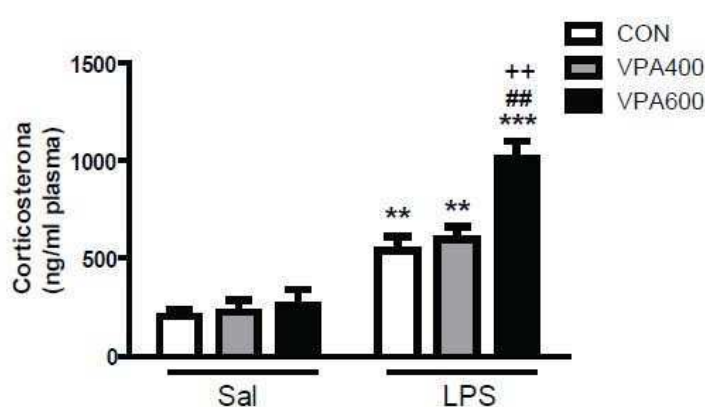
A las dos horas de la inyección, evaluamos los niveles de expresión de las citoquinas. El LPS ocasionó un aumento en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el bazo de todos los animales (efecto del tratamiento adulto: IL-1 $\beta$ ,  $F_{(1,24)}=52.263$ ,  $p<0.001$ ; IL-6,  $F_{(1,24)}=145.781$ ,  $p<0.001$ ; TNF- $\alpha$ ,  $F_{(1,24)}=79.046$ ,  $p<0.001$ ) y redujo la expresión de TGF- $\beta$ 1 ( $F_{(1,24)}=10.600$ ,  $p=0.003$ ) (figura IV.2). En el caso de IL-6 observamos una interacción significativa entre los tratamientos ( $F_{(2,24)}=8.008$ ,  $p=0.002$ ): los animales VPA400 y VPA600 estimulados con LPS mostraron mayores niveles de ARN mensajero para IL-6 en el bazo que los animales CON (figura IV.2-B).



**Figura IV.2. Efecto del VPA prenatal sobre la expresión de citoquinas en la periferia luego de un estímulo inflamatorio.** En el bazo, el LPS aumentó la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y redujo la expresión de la citoquina anti-inflamatoria TGF- $\beta$ 1. Todos los animales mostraron un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) y TNF- $\alpha$  (C) luego del estímulo inflamatorio de LPS. El aumento de IL-6 se vio exacerbado en los animales expuestos a VPA. También se observó una disminución general en los niveles de TGF- $\beta$ 1 luego del estímulo con LPS (D). N = 4-6 por grupo. Prueba de Tukey: \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  vs. el correspondiente grupo Sal; #  $p<0.05$ , ###  $p<0.001$  vs. el grupo CON-LPS. Se muestra la media  $\pm$  EE.

### IV.3.2 Sobre el eje HPA

Existen distintos estudios que caracterizan la respuesta del eje HPA en niños y adultos con DEA y muestran que los individuos autistas tienen una respuesta mayor del eje HPA ante un estímulo estresante (Corbett et al., 2006; Spratt et al., 2012). Como todo estímulo inmunológico representa también un estímulo estresante, además de medir la expresión de citoquinas decidimos medir en esos mismos animales los niveles de corticosterona a fin de evaluar la respuesta del eje HPA. El ANOVA de dos factores mostró una interacción significativa entre el tratamiento prenatal y el adulto en los niveles de corticosterona en plasma (interacción:  $F_{(2,20)}=5.874$ ,  $p=0.009$ ). No se observaron diferencias en los niveles basales de corticosterona entre los animales expuestos a VPA y los animales control. La inyección de LPS activó al eje HPA en todos los animales, pero esta activación se vio exacerbada en el grupo VPA600 (figura IV.3).



**Figura IV.3: Efecto del VPA prenatal sobre la respuesta del eje HPA luego de un estímulo inflamatorio.** Todos los animales mostraron un aumento en los niveles de corticosterona luego del estímulo inflamatorio de LPS. La respuesta del eje HPA de los animales VPA600 se vio exacerbada. N=4-6 por grupo. Prueba de Tukey: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. el correspondiente grupo Sal; ## $p<0.01$  vs. el grupo CON-LPS, ++ $p<0.01$  vs. el grupo VPA400-LPS. Se muestra la media  $\pm$  EE.

## IV.4 Efecto de un estímulo inflamatorio en el sistema nervioso central

### IV.4.1 Respuesta Molecular

Analizamos el efecto de la exposición prenatal a VPA (a partir de ahora lo llamaremos tratamiento prenatal) y de la estimulación con LPS en la adultez (a partir de ahora, tratamiento adulto) sobre la expresión de citoquinas en tres regiones del cerebro: cerebelo, hipocampo y corteza. En

estas regiones analizamos tanto la expresión basal (a 2 horas de la inyección de solución salina) como la expresión luego de un estímulo inflamatorio (a 2 horas de la inyección de LPS). En todos los casos analizamos los resultados por medio de un ANOVA de dos factores (tratamiento prenatal y tratamiento adulto) seguido de una prueba de Tukey en el caso que el ANOVA fuese significativo. Solo mencionamos los efectos significativos.

#### IV.4.1.1 Cerebelo

En el cerebelo, la expresión de IL-1 $\beta$  mostró un efecto del tratamiento adulto ( $F_{(1,23)}=7.300$ ,  $p=0.013$ ), particularmente evidente en los ratones VPA600 (figura IV.4-A). Los niveles de expresión de IL-6 y la de TNF- $\alpha$  presentaron perfiles similares, mostrando interacciones significativas entre el tratamiento prenatal y el tratamiento adulto (IL-6,  $F_{(2,23)}=16.044$ ,  $p<0.001$ ; TNF- $\alpha$ ,  $F_{(2,23)}=10.371$ ,  $p<0.001$ ): los niveles de ARNm de IL-6 y TNF- $\alpha$  fueron mayores en todos los grupos inyectados con LPS pero fueron aún mayores en los ratones VPA600 (figura IV.4-B y C). La expresión de TGF- $\beta$ 1 en el cerebelo no fue afectada por el tratamiento prenatal ni por el tratamiento adulto (figura IV.4-D).

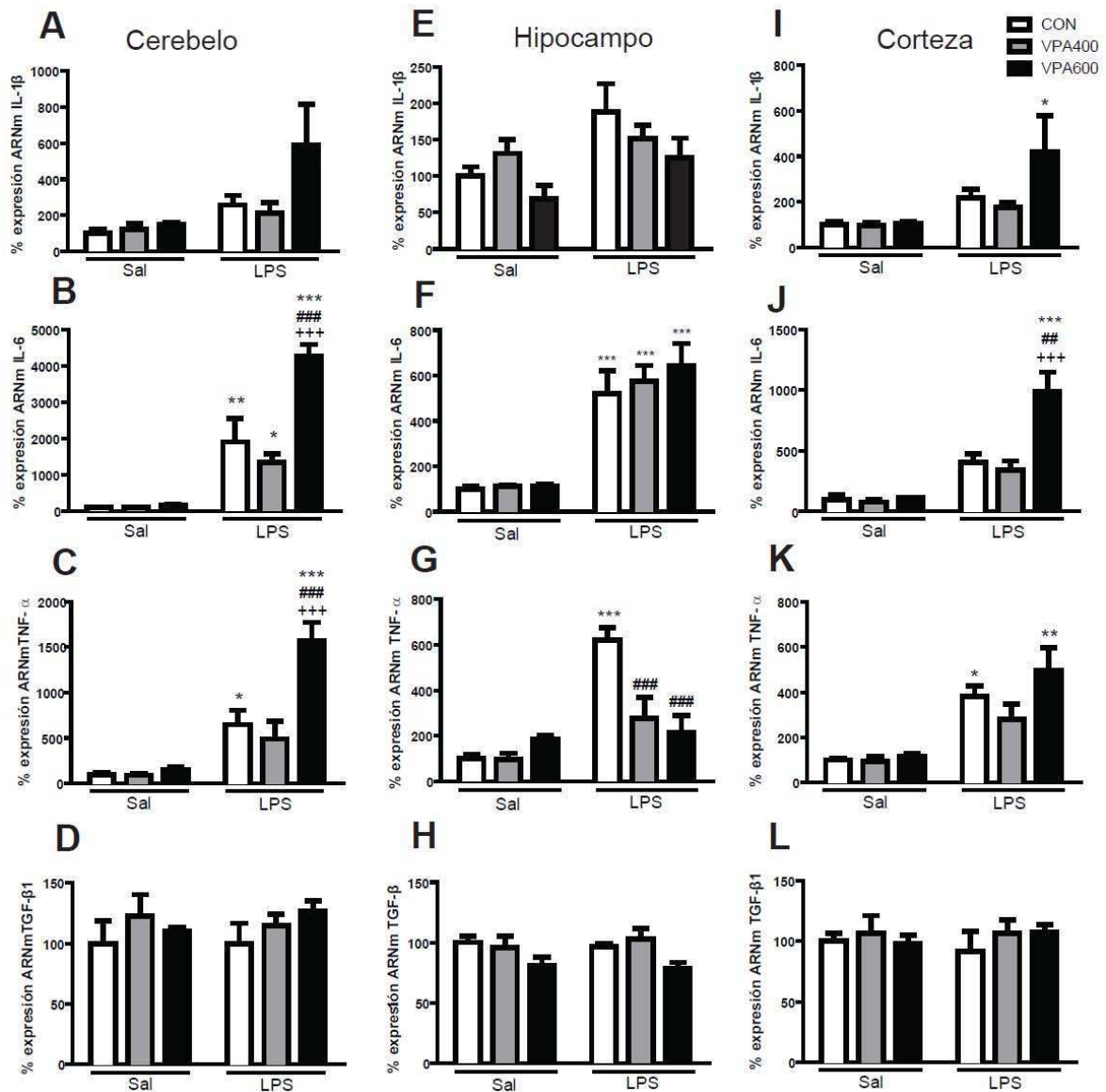
#### IV.4.1.2 Hipocampo

En el hipocampo, la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 mostró un efecto del tratamiento adulto (IL-1 $\beta$ ,  $F_{(1,24)}=9.431$ ,  $p=0.005$ ; IL-6,  $F_{(1,24)}=93.954$ ,  $p<0.001$ ): los animales inyectados con LPS mostraron un incremento en la expresión de estas citoquinas, efecto que fue más evidente para IL-6 (figura IV.4-E y F). La expresión de TNF- $\alpha$  mostró un perfil diferente, donde la interacción entre tratamientos fue significativa ( $F_{(2,22)}=13.682$ ,  $p<0.001$ ): los animales del grupo control mostraron un incremento significativo del ARNm de TNF- $\alpha$  en el hipocampo cuando fueron inyectados con LPS en la adultez, mientras que este efecto fue suavizado en los animales expuestos a VPA (figura IV.4-G). Para la citoquina anti-inflamatoria TGF- $\beta$ 1 encontramos un efecto general del tratamiento prenatal ( $F_{(2,21)}=4.826$ ,  $p=0.019$ ), siendo los animales VPA600 los que expresan menores niveles de esta citoquina, independientemente del tratamiento adulto (figura IV.4-H).

#### IV.4.1.3 Corteza

En la corteza, el análisis de la expresión de IL-1 $\beta$  mostró un efecto del tratamiento adulto ( $F_{(1,24)}=9.287$ ,  $p=0.005$ ), particularmente evidente en los ratones VPA600 estimulados con LPS, quienes muestran mayor nivel de expresión de esta citoquina (figura IV.4-I). En cuanto a la expresión de IL-6, detectamos una interacción significativa entre los tratamientos prenatal y adulto ( $F_{(1,24)}=9.508$ ,  $p<0.001$ ): los ratones VPA600 mostraron una respuesta exacerbada ante el estímulo inflamatorio (figura IV.4-J). La expresión de TNF- $\alpha$  se vio afectada por el tratamiento prenatal ( $F_{(2,24)}=3.471$ ,  $p=0.047$ ) y por el tratamiento adulto ( $F_{(1,24)}=42.285$ ,  $p<0.001$ ). Los 3 grupos de animales mostraron un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  luego de la estimulación con LPS (figura IV.4-K), aumento que alcanzó significancia estadística en el grupo de animales CON y VPA600. En contraposición a los anteriores resultados, la expresión de TGF- $\beta$ 1 no fue afectada ni por el tratamiento prenatal ni por el tratamiento adulto (figura IV.4-L).





**Figura IV.4. Efecto de un estímulo de LPS periférico sobre la expresión de citoquinas en el cerebro de ratones expuestos prenatalmente a VPA.** Los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en el cerebelo, hipocampo y corteza son examinados 2 h después de una estimulación con LPS. Los valores obtenidos mediante PCR en tiempo real son expresados como porcentaje del CON-Sal. Se observó una tendencia en la expresión de IL-1 $\beta$  a aumentar en el cerebelo de los animales del grupo VPA600-LPS (A), no se vio alterada en el hipocampo (E) y aumentó significativamente en la corteza de los animales VPA600 estimulados con LPS (I). El LPS indujo la expresión de IL-6 en las 3 regiones, aunque en el cerebelo (B) y en la corteza (J) los animales VPA600 mostraron una expresión aún mayor. El LPS periférico también indujo la expresión de TNF- $\alpha$  en las 3 regiones del cerebro, aunque esta inducción fue mayor en el cerebelo de animales VPA600 (C), menor en el hipocampo de animales VPA400 y VPA600 (G), e igual en la corteza de los 3 grupos (K). No se observaron diferencias en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en las zonas analizadas (D, H y L). N = 4-6 por grupo. Prueba de Tukey: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 vs. el correspondiente grupo Sal; ### p < 0.001 vs. el correspondiente grupo CON; +++ p < 0.001 vs. el correspondiente grupo VPA400. Se grafica la media  $\pm$  EE.

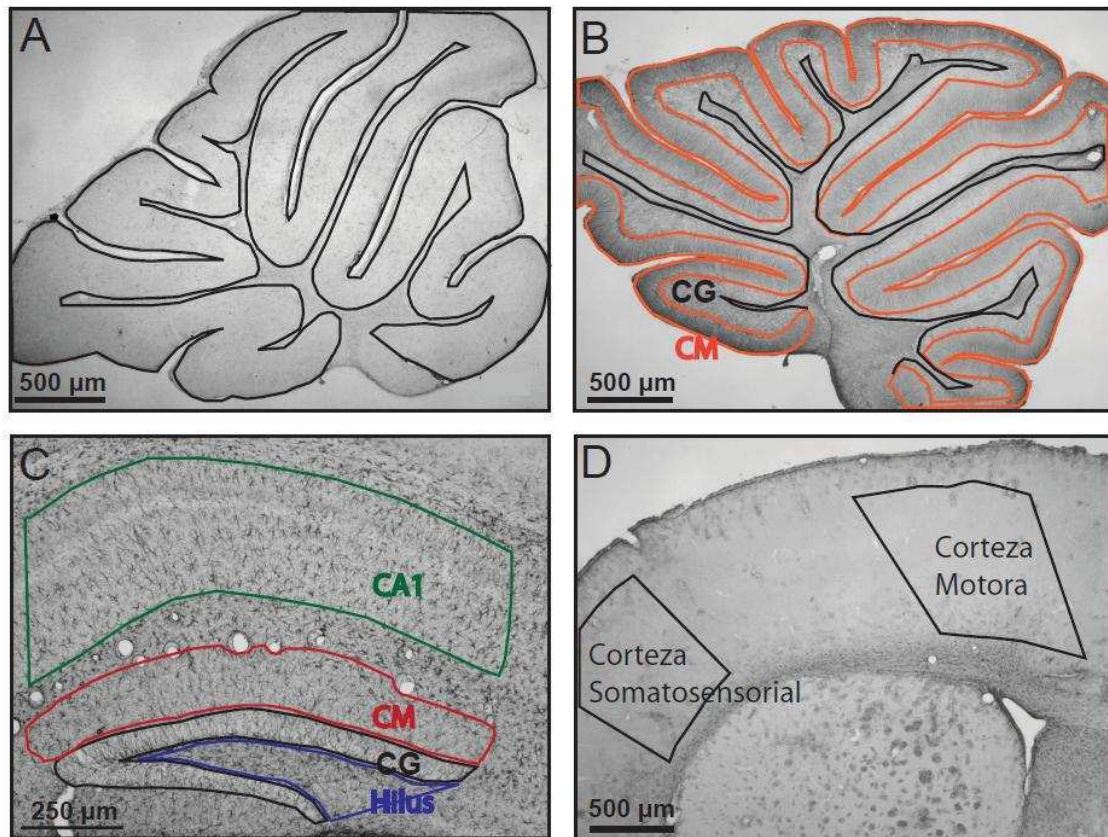
#### *IV.4.2 Respuesta celular*

Para caracterizar la activación glial en nuestro modelo analizamos el efecto del tratamiento prenatal y del tratamiento adulto sobre el estado de activación de la astroglia y de la microglia en las mismas tres regiones del cerebro: el cerebelo, el hipocampo y la corteza. En un estudio preliminar observamos diferencias cualitativas en la distribución de células dentro de cada región, diferencias en algunos casos tan grandes que podrían apantallar posibles diferencias debidas al tratamiento. Para evitar esto, decidimos subdividir cada región en áreas más pequeñas de modo de asegurarnos que cada zona estudiada tuviese una distribución celular homogénea. Las áreas seleccionadas dentro de cada región se muestran en la figura IV.5. En todos los casos se llevaron a cabo análisis de ANOVA de dos factores (tratamiento prenatal y tratamiento adulto) seguidos de la prueba de Tukey.

Para estudiar el estado de activación de la microglia analizamos la densidad celular y el tamaño del soma, mientras que para estudiar el estado de activación de la astroglia analizamos el porcentaje de área marcada positivamente para GFAP.

En Materiales y Métodos se detalla cada análisis (secciones II.7.1 y II.7.2 respectivamente), pero es necesario hacer aquí unas aclaraciones. En cuanto a la microglia, se han descrito clásicamente diferentes estadios de activación usando parámetros morfológicos: la célula en estado de reposo o en condiciones fisiológicas tiene una estructura ramificada, con prolongaciones finas y largas y, en presencia de un estímulo, se activa, adoptando formas intermedias, más redondeadas y con prolongaciones más cortas y, finalmente, el máximo estadio de activación lo constituye un estado fagocítico, en el cual la célula se observa redondeada, sin prolongaciones y resulta indistinguible de un macrófago (Kreutzberg, 1996). A medida que avanzábamos en el análisis de este tipo celular, no detectamos diferencias evidentes en la morfología entre los distintos grupos experimentales. Por esa razón medimos el tamaño del soma, ya que esta medida podría permitirnos detectar cambios pequeños o sutiles en su morfología, de manera objetiva.

En cuanto a la astroglia, la activación podría observarse tanto como un aumento en el número de células o bien como un engrosamiento de sus prolongaciones. Por esta razón fue que decidimos analizar el porcentaje de área marcada con GFAP, ya que este dato nos brinda información de cualquiera de las dos posibles variables que nos indican activación. En todas las regiones, el análisis fue realizado sólo en la sustancia gris.

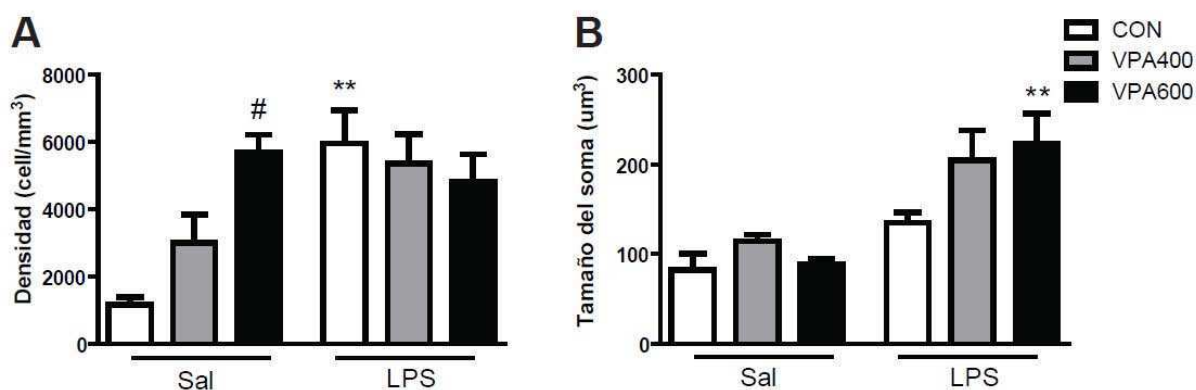


**Figura IV.5. Áreas seleccionadas para la cuantificación de microglia y astroglia.** En el cerebelo la microglia se cuantificó en una sola área (A), mientras que la astroglia se cuantificó en dos áreas: CG y CM (B). En el hipocampo la división en áreas fue la misma tanto para microglia como astroglia: CA1, CM, CG y hilus (C). En la corteza las áreas también fueron iguales para microglia y astroglia: corteza somatosensorial y motora (D). CM, capa molecular; CG, capa granular.

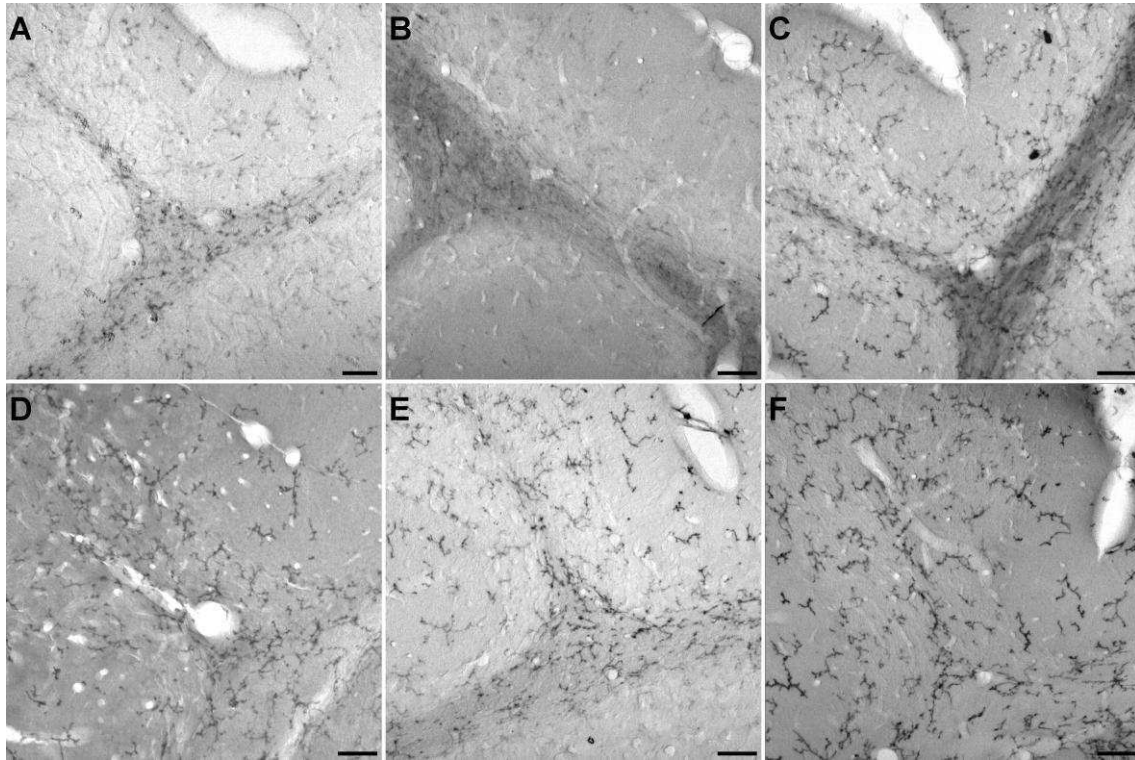
#### IV.4.2.1 Cerebelo

En un corte histológico de cerebelo podemos distinguir una capa externa de sustancia gris y una región interna de sustancia blanca. En la capa de sustancia gris, a su vez, podemos identificar una capa molecular y una capa de células granulares. Entre ambas capas se sitúa la capa de somas de las células de Purkinje.

Al observar la **microglia** en el cerebelo, notamos una distribución homogénea de estas células en las distintas capas de la sustancia gris, por lo que no delimitamos áreas para el análisis de la densidad en esta región. Observamos una interacción significativa entre el tratamiento prenatal y el tratamiento adulto ( $F_{(2,18)}=5.849$ ,  $p=0.011$ ): a nivel basal los animales VPA600 mostraron mayor densidad de células de la microglia que los animales CON. Por otra parte, los tres grupos inyectados con LPS mostraron un aumento en la densidad independientemente del tratamiento prenatal (figura IV.6-A). Este efecto en la densidad de células no fue aditivo: al aumento observado en el grupo VPA600 no se le “sumó” el aumento ocasionado por el LPS. Sin embargo, el tamaño del soma sólo se vio afectado por el tratamiento adulto ( $F_{(1,18)}=27.676$ ,  $p<0.001$ ): el estímulo de LPS causó un aumento significativo del tamaño del soma de la microglia en los animales VPA600 (figura IV.6-B). Se muestran fotografías representativas en la figura IV-7.



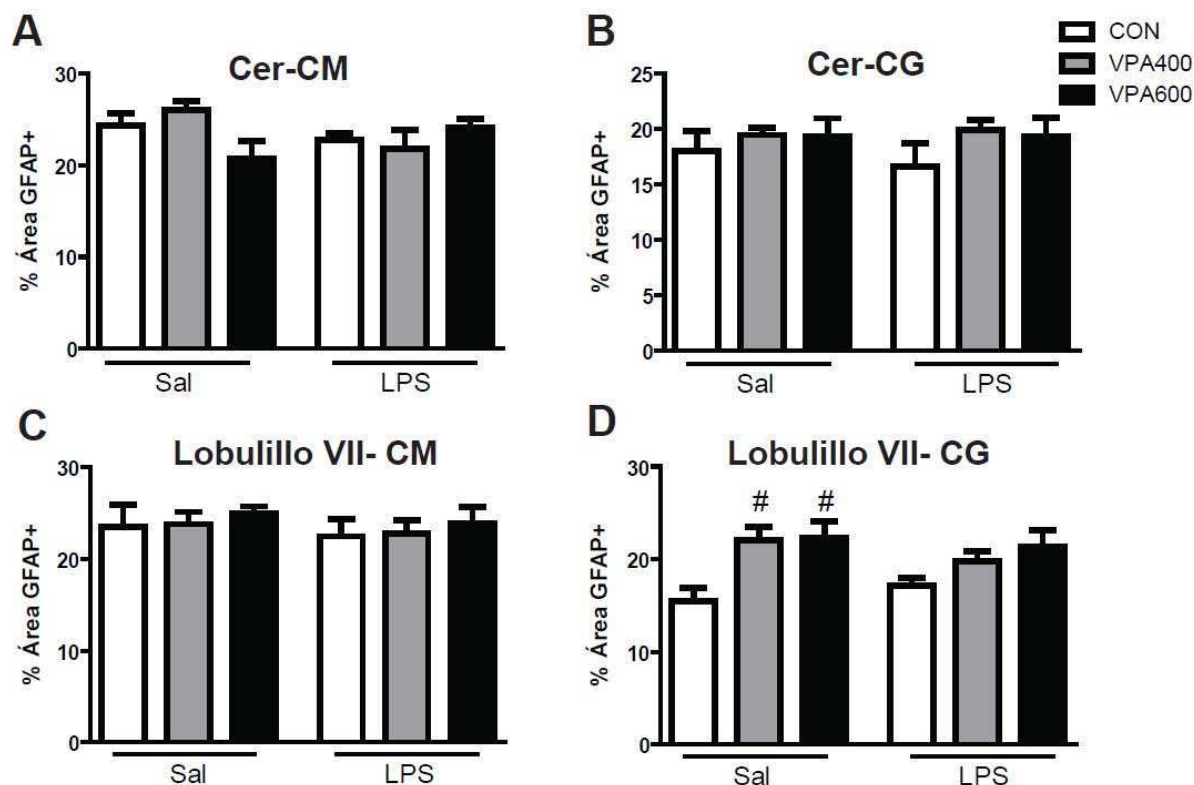
**Figura IV.6. Los ratones expuestos a VPA mostraron un aumento en la activación de la microglia en el cerebelo.** Los animales VPA mostraron más células de la microglia en el cerebelo (**A**) y estas células muestran una morfología más activada luego de la estimulación con LPS (**B**). N = 3-4 por grupo. Prueba de Tukey: \*\* $p < 0.01$  vs. el correspondiente grupo Sal; #  $p < 0.05$  vs. el correspondiente grupo CON. Se grafica la media  $\pm$  EE.



**Figura IV.7. Inmunohistoquímica para visualizar células de la microglia (CD11b-positivas) en el cerebelo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 100  $\mu$ m). Grupo CON-Sal (**A**). Grupo VPA400-Sal (**B**). Grupo VPA600-Sal (**C**). Grupo CON-LPS (**D**). Grupo VPA400-LPS (**E**). Grupo VPA600-LPS (**F**).

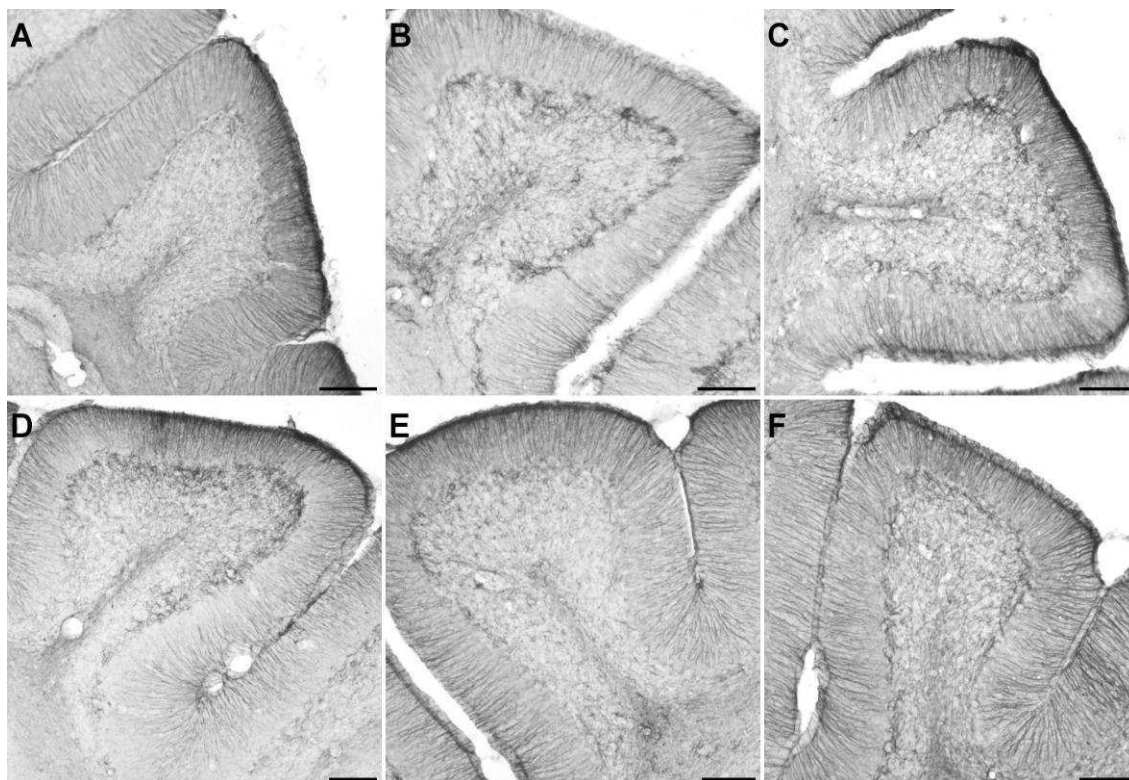
Con respecto a la **astroglia**, en el cerebelo las células GFAP-positivas muestran una distribución muy característica: los cuerpos celulares de la astroglia de la capa molecular (llamada glia de Bergmann) están ubicados entre los cuerpos celulares de las células de Purkinje, proyectando sus prolongaciones a través de la capa molecular formando una empalizada, mientras que en la capa granular se encuentran dispersas de manera aleatoria. Fue por eso que delimitamos en esta región dos áreas: la capa molecular (incluyendo en ella a los cuerpos celulares de las células gliales de Bergmann) y la capa granular (Figura IV.4).

En la capa molecular, observamos un efecto del tratamiento adulto en el porcentaje del área GFAP-positiva ( $F_{(1,17)}=7.815$ ,  $p=0.012$ ), debido a una disminución general de esta área en los animales inyectados con LPS (figura IV.8-A).



**Figura IV.8. Los ratones expuestos a VPA mostraron un aumento en la activación astrogliar en el cerebelo.** No hay diferencias en el porcentaje de área GFAP+ en la capa molecular (A) o en la capa granular (B) del cerebelo. Cuando el análisis se circunscribe al lobulillo VII, no se observan diferencias en la capa molecular (C) pero sí en la capa granular (D). Los animales expuestos a VPA muestran un aumento en el área marcada, aumento significativo en el caso de los animales no estimulados. N = 3-4 por grupo. Prueba de Tukey: #  $p < 0.05$  vs. el correspondiente grupo CON. Se grafica la media  $\pm$  EE.

En la capa granular ninguno de los tratamientos afectó el porcentaje de área GFAP-positiva (figura IV.8-B). Decidimos evaluar específicamente el lobulillo VII, el cual se ha relacionado con la modulación en los niveles de sociabilidad (ver capítulo V). En la capa molecular del lobulillo VII no observamos ningún efecto de los tratamientos (figura IV.8-C), mientras que el análisis en la capa granular mostró una interacción significativa entre el tratamiento prenatal y el tratamiento adulto ( $F_{(2,17)}=8.747$ ,  $p=0.002$ ), consecuencia de un aumento del porcentaje de área marcada con GFAP en animales expuestos prenatalmente a VPA (figura IV.8-D). Se muestran imágenes representativas en la figura IV.9. Cabe mencionar que no observamos diferencias en los porcentajes de área GFAP-positiva en ninguno de los otros lobulillos.



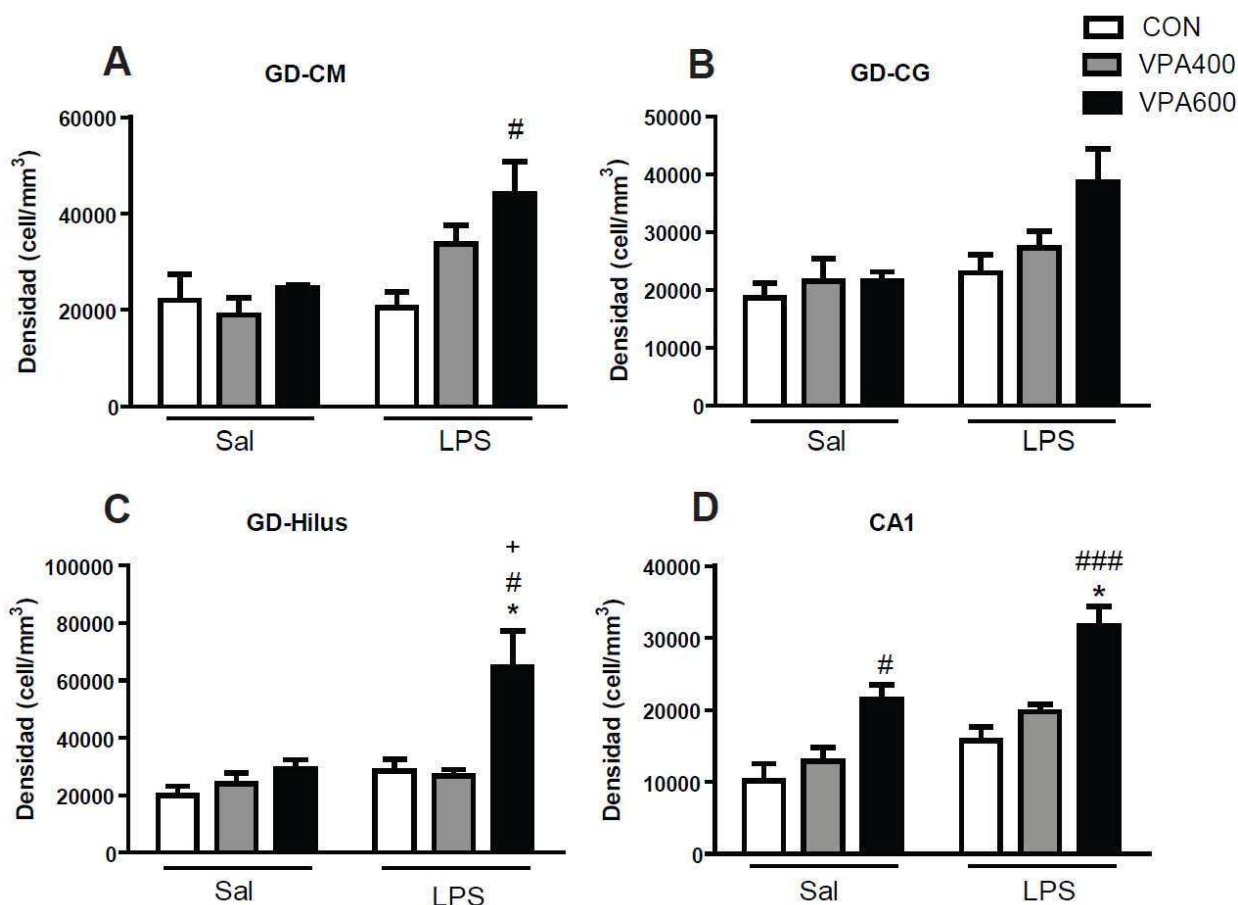
**Figura IV.9. Inmunohistoquímica para visualizar células astrogliales (GFAP-positivas) en el cerebelo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 100  $\mu$ m). Grupo CON-Sal (**A**). Grupo VPA400-Sal (**B**). Grupo VPA600-Sal (**C**). Grupo CON-LPS (**D**). Grupo VPA400-LPS (**E**). Grupo VPA600-LPS (**F**).

#### IV.4.2.2 Hipocampo

En el hipocampo decidimos analizar tanto el giro dentado (GD) como la zona CA1. En el GD existen 3 áreas que se distinguen muy bien, y cada una de ellas tiene una distribución celular característica: la capa molecular (CM), la capa de células granulares (CG) y el hilus (figura IV.4-C). En la capa CA1 la distribución es homogénea.

Al analizar la **microglia**, la cuantificación estereológica de la capa molecular del GD mostró un efecto sobre la densidad celular tanto del tratamiento prenatal ( $F_{(2,15)}=4.032$ ,  $p=0.040$ ) como del tratamiento adulto ( $F_{(1,15)}=8.331$ ,  $p=0.011$ ). La densidad de células de la microglia en esta región fue mayor en los ratones VPA600 que habían sido estimulados con LPS, que en los ratones CON (figura IV.10-A). En la figura IV.11 se

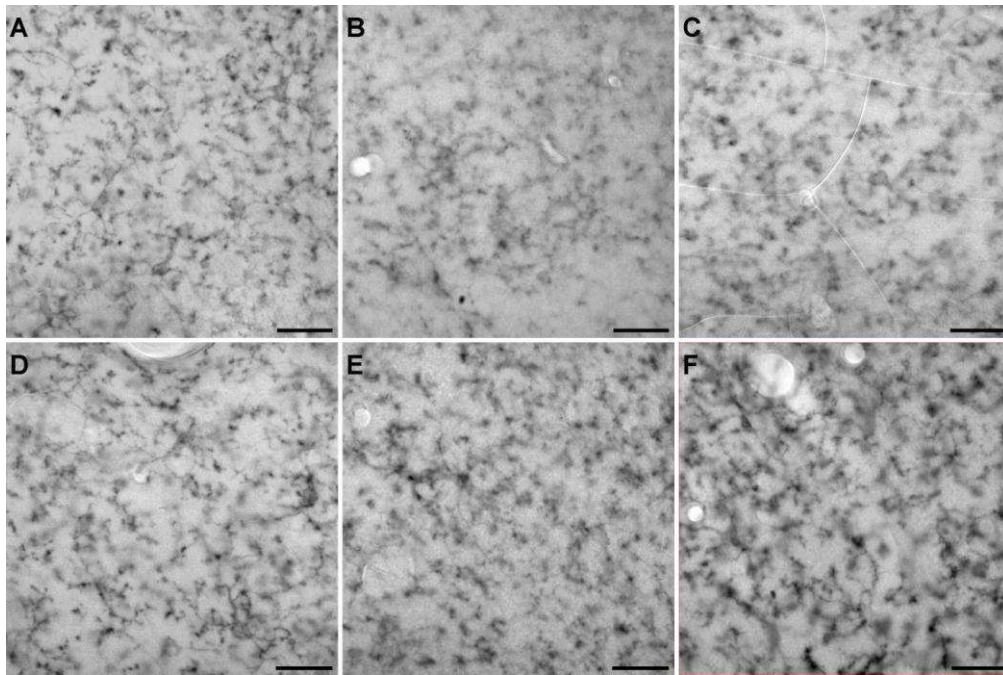
muestran inmunohistoquímicas representativas de esta región, realizadas utilizando un anticuerpo anti CD11b.



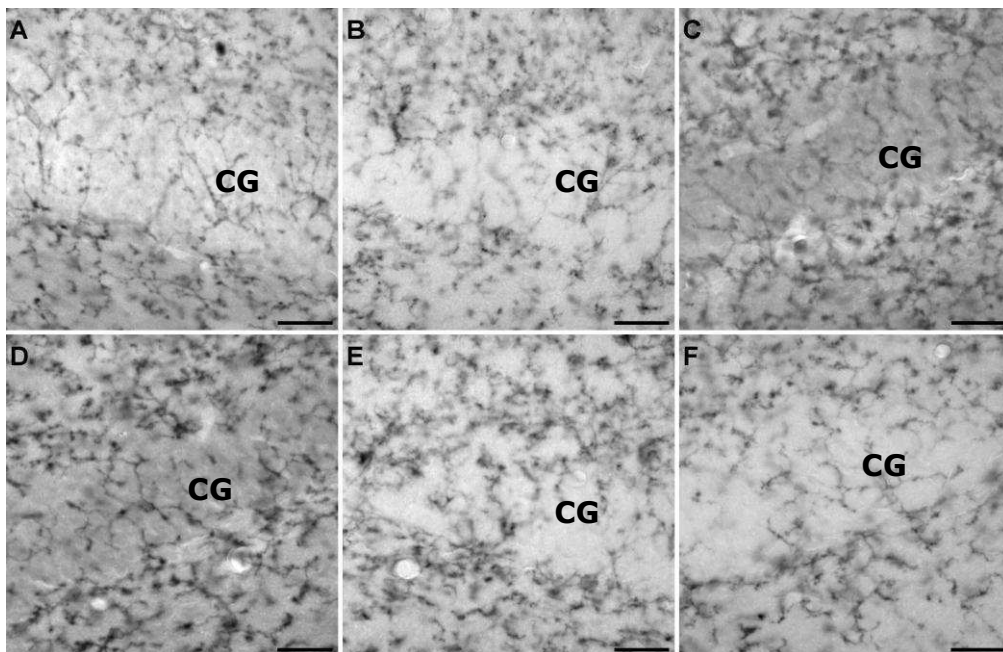
**Figura IV.10. Los ratones expuestos a VPA mostraron un aumento en la activación de la microglía en el hipocampo.** El análisis de células de la microglía (CD11b-positivas) mostró un aumento en la densidad de estas células en el giro dentado (GD) (A-C) y en CA1 (D) del hipocampo en animales expuestos a VPA y estimulados con LPS en la adultez. N=3-4 por grupo. Prueba de Tukey: \* p<0.05 vs. el correspondiente grupo Sal; # p<0.05, ### p<0.001 vs. el correspondiente grupo CON; + p<0.05 vs. el correspondiente grupo VPA400. Se grafica la media ± EE.

En la capa de células granulares del GD observamos un efecto del tratamiento adulto sobre la densidad de células de la microglía ( $F_{(1,15)}=7.277$ ,  $p=0.017$ ): los ratones VPA600 inyectados con LPS mostraron una tendencia a un mayor número de células de la microglía en comparación con ratones VPA600 inyectados con solución salina ( $p=0.051$ ; figura IV.10-B). En la figura IV.12 se muestran inmunohistoquímicas representativas de esta región, realizadas utilizando un anticuerpo anti CD11b.





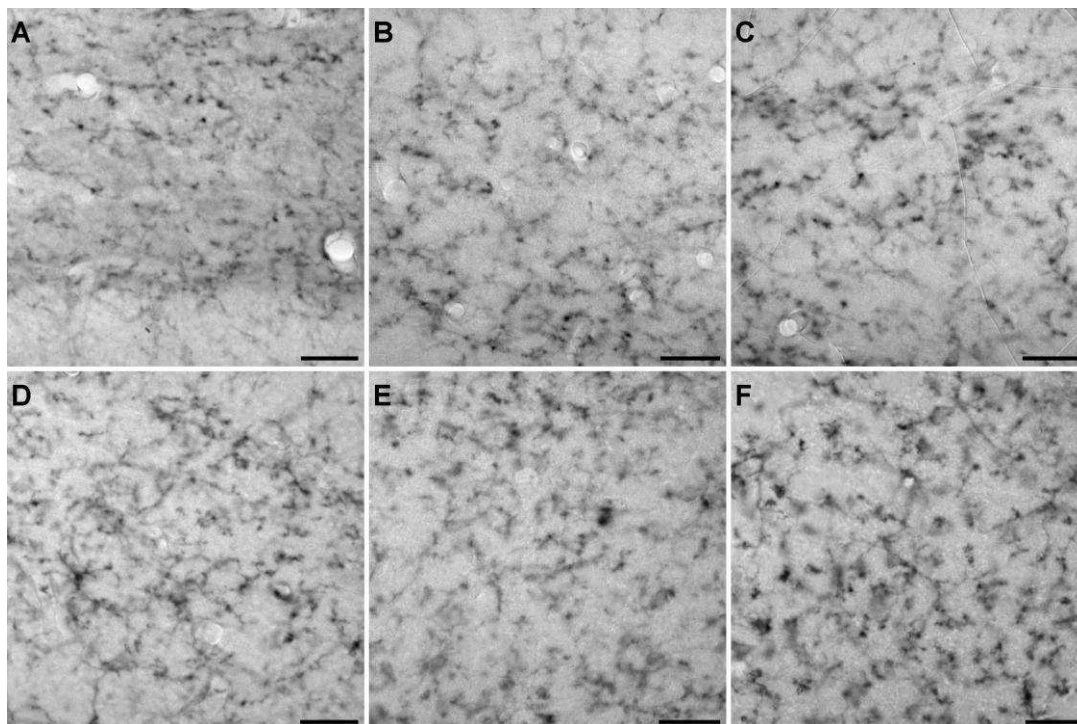
**Figura IV.11. Inmunohistoquímica para visualizar las células de la microglia (CD11b-positivas) en la capa molecular del giro dentado del hipocampo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 20  $\mu$ m). Grupo CON-SAL (A). Grupo VPA400-SAL (B). Grupo VPA600-SAL (C). Grupo CON-LPS (D). Grupo VPA400-LPS (E). Grupo VPA600-LPS (F).



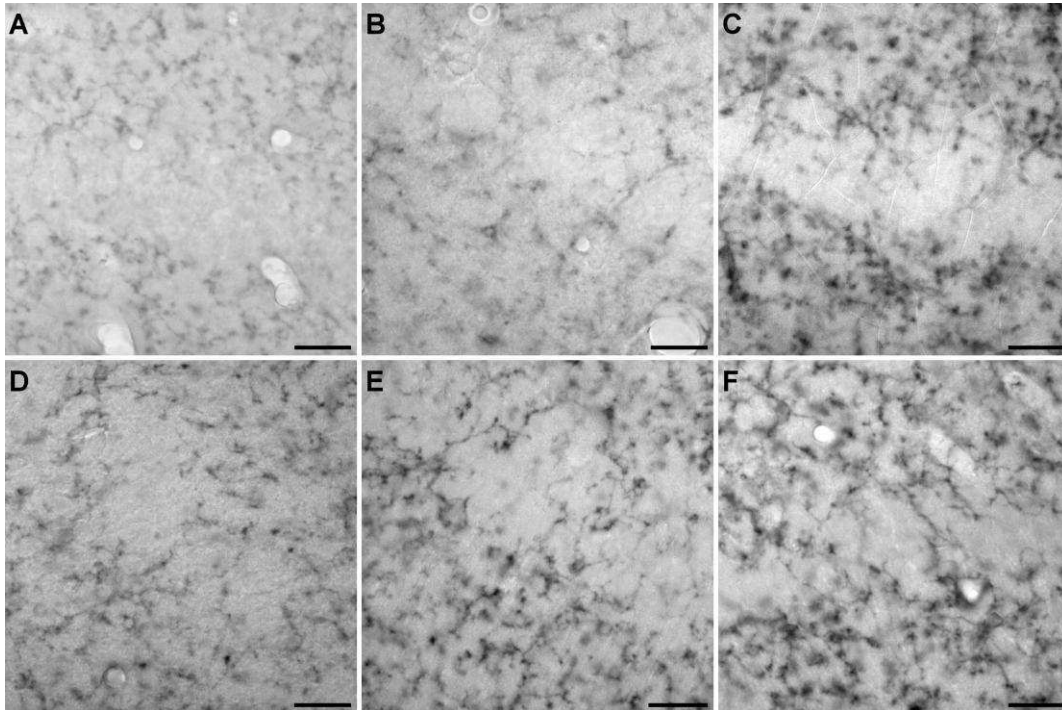
**Figura IV.12. Inmunohistoquímica para visualizar las células de la microglia (CD11b-positivas) en la capa granular del giro dentado del hipocampo.** La capa granular es la franja ubicada centralmente en la imagen (CG). Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 20  $\mu$ m). Grupo CON-SAL (A). Grupo VPA400-SAL (B). Grupo VPA600-SAL (C). Grupo CON-LPS (D). Grupo VPA400-LPS (E). Grupo VPA600-LPS (F).

En el hilus, el análisis de la microglia mostró efecto tanto del tratamiento prenatal ( $F_{(2,15)}=6.879$ ,  $p=0.008$ ) como del tratamiento adulto ( $F_{(1,15)}=7.720$ ,  $p=0.014$ ): sólo los ratones VPA600 mostraron un aumento de la densidad de células de la microglia luego del estímulo con LPS (figura IV.9-C). En la figura IV.13 se muestran inmunohistoquímicas representativas de esta región, realizadas utilizando un anticuerpo anti CD11b.

En la zona CA1 del hipocampo, la densidad de células de la microglia se vio afectada tanto por el tratamiento prenatal ( $F_{(2,15)}=22.135$ ,  $p<0.001$ ) como por el tratamiento adulto ( $F_{(1,15)}=18.650$ ,  $p<0.001$ ). Los animales VPA600 mostraron una mayor densidad de células de la microglia en esta región. Además, la inyección de LPS resultó en un aumento en la densidad de estas células en el grupo VPA600, y no en los otros grupos (figura IV.10-D). En la figura IV.14 se muestran inmunohistoquímicas representativas de esta región, realizadas utilizando un anticuerpo anti CD11b.

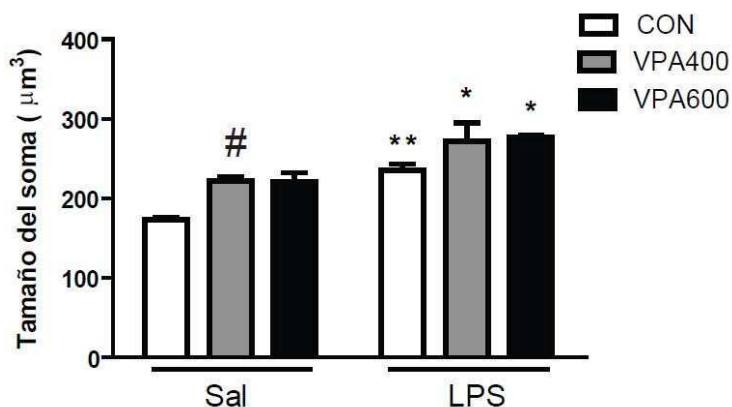


**Figura IV.13. Inmunohistoquímica para visualizar las células de la microglia (CD11b-positivas) en el hilus del giro dentado del hipocampo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ ). Grupo CON-SAL (A). Grupo VPA400-SAL (B). Grupo VPA600-SAL (C). Grupo CON-LPS (D). Grupo VPA400-LPS (E). Grupo VPA600-LPS (F).



**Figura IV.14. Inmunohistoquímica para visualizar las células de la microglia (CD11b-positivas) en la capa CA1 del hipocampo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ ). Grupo CON-Sal (A). Grupo VPA400-Sal (B). Grupo VPA600-Sal (C). Grupo CON-LPS (D). Grupo VPA400-LPS (E). Grupo VPA600-LPS (F).

Cuando analizamos el tamaño del soma de las células de la microglia presentes en el hipocampo, observamos que tanto el tratamiento prenatal ( $F_{(2,15)}=12.308$ ,  $p<0.001$ ) como el tratamiento adulto ( $F_{(1,15)}=45.456$ ,  $p<0.001$ ) afectan dicha variable. La exposición prenatal a 400 mg/kg de VPA y el estímulo de LPS en adultos aumentan el tamaño del cuerpo celular de las células de la microglia (figura IV.15), sugiriendo que este estímulo lleva a las células a un estado más activado.



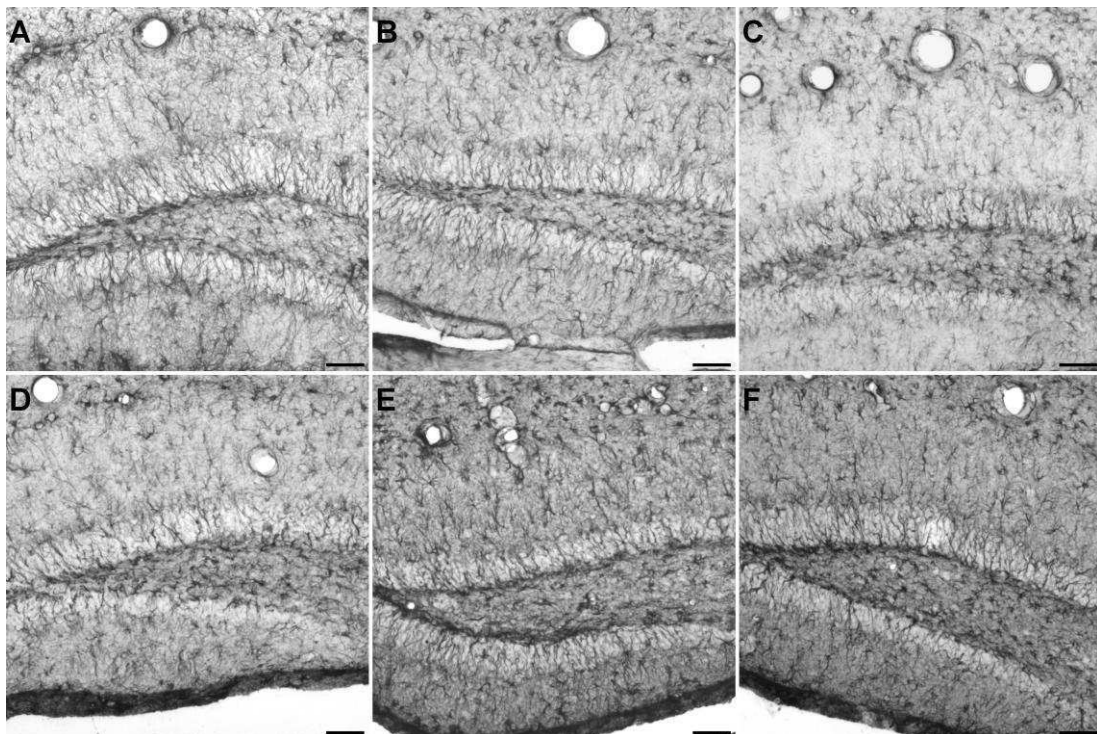
**Figura IV.15. Efecto de la exposición al VPA en el tamaño de la microglia en el hipocampo.**

El análisis de células de la microglia (CD11b-positivas) mostró un aumento en el tamaño del soma de estas células luego de la inyección con LPS. N=3-4 por grupo. Prueba de Tukey: \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  vs. el correspondiente grupo Sal; #  $p<0.05$  vs. el correspondiente grupo CON. Se grafica la media  $\pm$  EE.

Con respecto a la **astroglia**, el área ocupada por este tipo celular en la capa molecular fue afectada por el tratamiento prenatal ( $F_{(2,18)}=4.689$ ,  $p=0.023$ ) y adulto ( $F_{(1,18)}=10.889$ ,  $p=0.004$ ): observamos un aumento general del área ocupada por astrocitos en animales estimulados con LPS (figura IV.17-A).

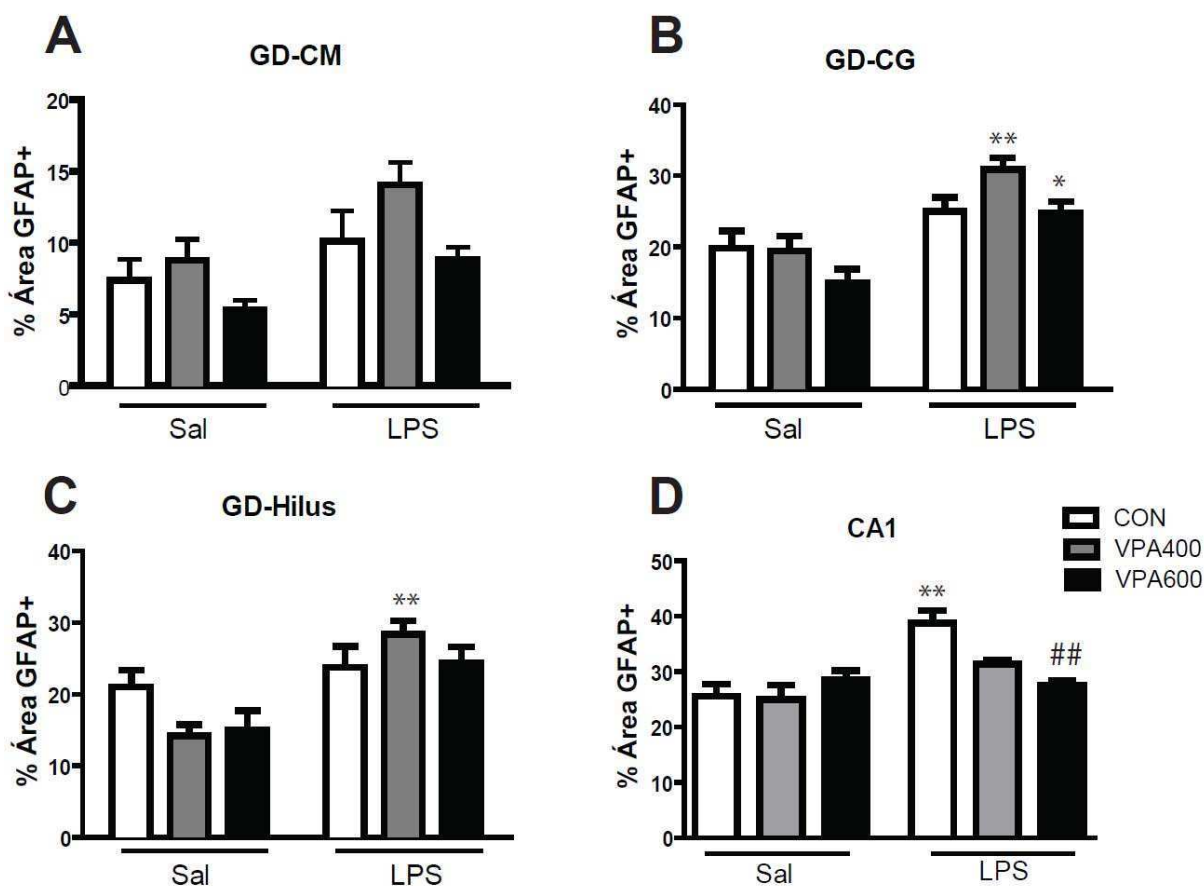
En la capa de células granulares del giro dentado observamos un efecto tanto del tratamiento prenatal ( $F_{(2,18)}=3.599$ ,  $p=0.048$ ) como del tratamiento adulto ( $F_{(1,18)}=29.712$ ,  $p<0.001$ ) en el porcentaje de área GFAP-positiva: en los ratones VPA400 y VPA600 el estímulo con LPS aumentó el área ocupada por astrocitos, algo que no se observó en los ratones CON (figura IV.17-B).

En el hilus el área ocupada por astrocitos fue sólo afectada por el tratamiento adulto ( $F_{(1,18)}=21.337$ ,  $p<0.001$ ). Hubo un aumento general del área GFAP-positiva luego de la inyección de LPS, la cual fue estadísticamente significativa en el grupo VPA400 (figura IV.17-C).



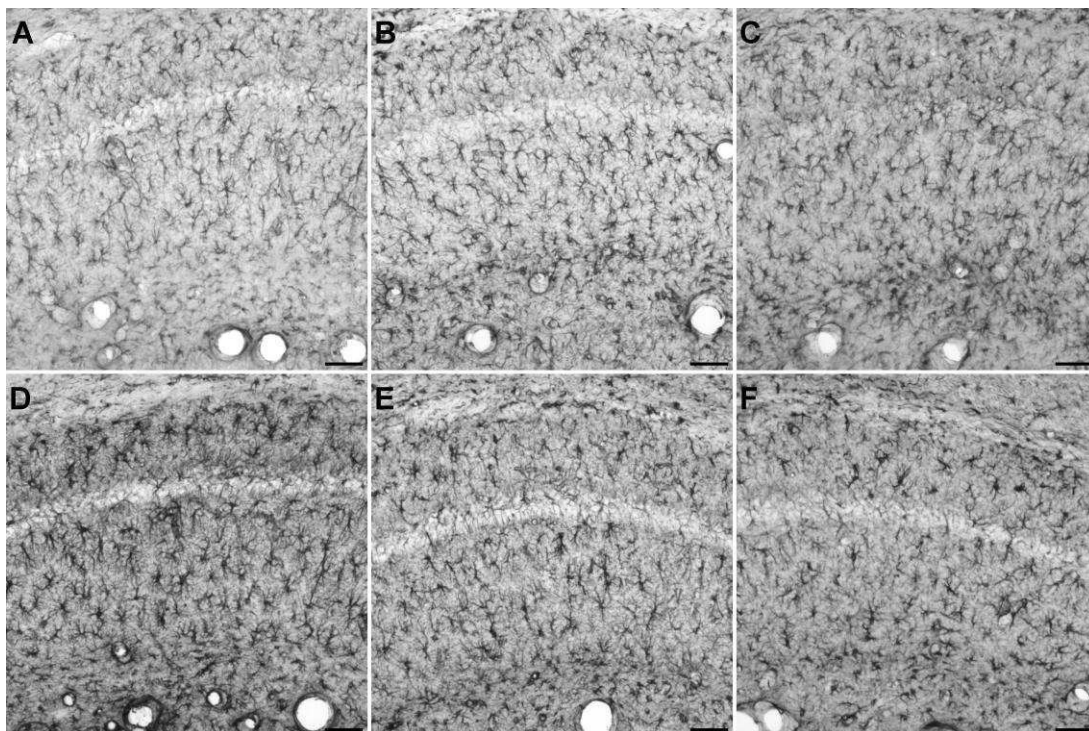
**Figura IV.16. Inmunohistoquímica para visualizar las células astrogliales (GFAP-positivas) en el giro dentado del hipocampo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ). Grupo CON-Sal (A). Grupo VPA400-Sal (B). Grupo VPA600-Sal (C). Grupo CON-LPS (D). Grupo VPA400-LPS (E). Grupo VPA600-LPS (F).

En la figura IV.16 se muestran inmunohistoquímicas representativas de las tres áreas del giro dentado, realizadas utilizando un anticuerpo anti GFAP.



**Figura IV.17. Los ratones expuestos a VPA mostraron un aumento en la activación de la astrogliosis en el hipocampo.** El análisis del porcentaje de área GFAP-positiva en el GD (A-C) y en CA1 (D) mostró que la astrogliosis está menos afectada en el hipocampo. N=3-4 por grupo. Prueba de Tukey: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. el correspondiente grupo Sal; ##  $p < 0.01$  vs. el correspondiente grupo CON. Se grafica la media  $\pm$  EE.

En CA1, el porcentaje del área GFAP-positiva se vio afectado por el tratamiento adulto ( $F_{(1,18)} = 16.897$ ,  $p < 0.001$ ), observándose también una interacción entre los tratamientos prenatal y adulto ( $F_{(2,18)} = 7.407$ ,  $p = 0.004$ ). Los ratones del grupo control mostraron un incremento del área GFAP-positiva luego de la inyección de LPS en la adultez, pero en los animales VPA400 y VPA600 este efecto no fue observado (figura IV.17-D). En la figura IV.18 se muestran inmunohistoquímicas representativas de esta región, realizadas utilizando un anticuerpo anti GFAP.



**Figura IV.18. Inmunohistoquímica para visualizar las células astrogliales (GFAP-positivas) en la capa CA1 del hipocampo.** Las fotos mostradas son representativas de cada grupo (barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ). Grupo CON-Sal (**A**). Grupo VPA400-Sal (**B**). Grupo VPA600-Sal (**C**). Grupo CON-LPS (**D**). Grupo VPA400-LPS (**E**). Grupo VPA600-LPS (**F**).

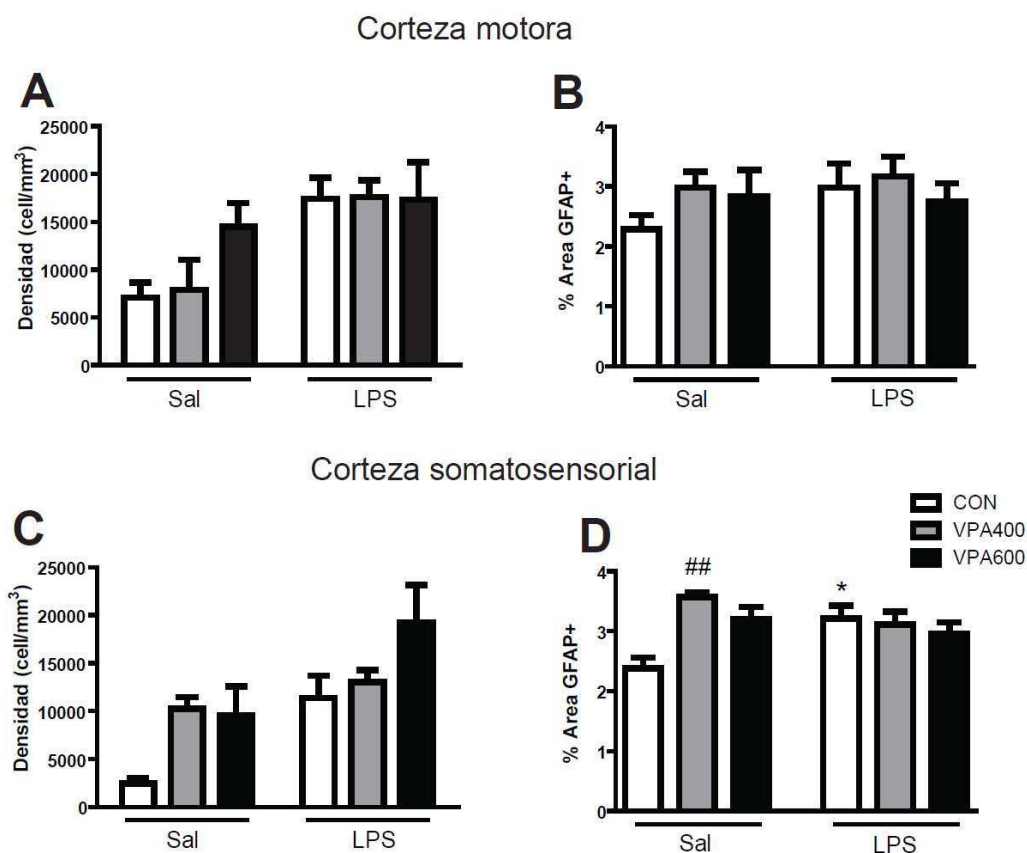
#### IV.4.2.3 Corteza

En la corteza analizamos dos áreas diferentes: un área que comprende parte de la corteza motora primaria y secundaria, y otra área que comprende parte de la corteza somatosensorial (figura IV.4-D).

En la **corteza motora** observamos un efecto del tratamiento adulto en la densidad de células de la microglia ( $F_{(1,16)}=11.191$ ,  $p=0.004$ ), luego del estímulo de LPS los animales mostraron un aumento general de estas células. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos cuando hicimos la prueba de Tukey (figura IV.19-A). Ni el tratamiento prenatal ni el postnatal afectaron el porcentaje de área ocupada por la astroglia en esta región (figura IV.19-B).

En la **corteza somatosensorial** la densidad de células de la microglia fue afectada tanto por el tratamiento prenatal ( $F_{(2,16)}=4.587$ ,  $p=0.027$ ) como por el tratamiento adulto ( $F_{(1,16)}=12.834$ ,  $p=0.002$ ). Estos resultados corresponden al análisis global, pero al comparar los 6 grupos no

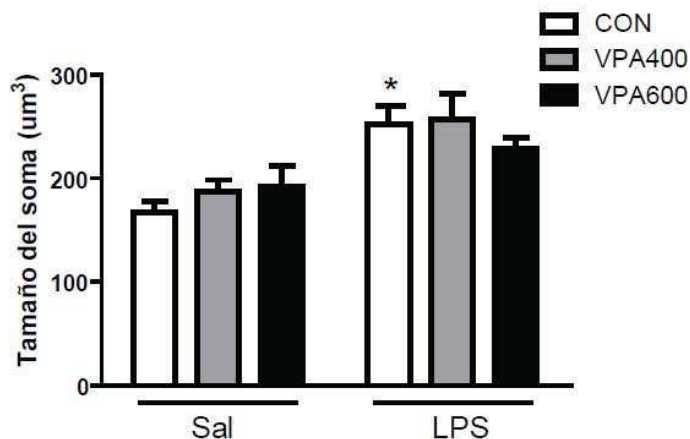
encontramos diferencias entre ellos (figura IV.19-C). Al analizar el porcentaje de área ocupada por la astroglia, observamos una interacción entre el tratamiento prenatal y el adulto ( $F_{(2,17)}=7.147$ ,  $p=0.006$ ): en el grupo de animales no estimulados, los animales VPA muestran una mayor área GFAP positiva, significativamente aumentada en el grupo VPA400. En cambio, sólo el grupo CON es afectado por el estímulo de LPS. Este aumento sólo del grupo control podría indicar que los demás grupos ya han alcanzado un techo, que no es posible aumentar con el estímulo adulto (figura IV.19-D).



**Figure IV.19. Los ratones expuestos a VPA mostraron pequeñas diferencias en la activación glial en la corteza.** El análisis estereológico de la microglia en la corteza motora (A) y en la corteza somatosensorial (C) mostró un efecto general de los tratamientos pero no diferencias significativas entre los grupos. El porcentaje de área GFAP-positiva en la corteza motora (B) y en la corteza somatosensorial (D) no se vio modificado por el tratamiento. N=3-4 por grupo. Prueba de Tukey: \*  $p < 0.05$  vs. el correspondiente grupo Sal; ##  $p < 0.01$  vs. el correspondiente grupo CON. Se grafica la media  $\pm$  EE.

Finalmente, el tamaño de los somas celulares de la microglia en la corteza se vio afectado por el tratamiento adulto, se observó un aumento

general en el tamaño en los grupos estimulados con LPS ( $F_{(1,16)}=20.251$ ,  $p<0.001$ ), aumento que muestra ser estadísticamente significativo para el grupo de animales CON (figura IV.20).



**Figura IV.20. Efecto de la exposición al VPA en el tamaño de la microglia en la corteza.** El análisis de células de la microglia (CD11b-positivas) mostró que la estimulación con LPS causó un aumento en el tamaño del soma de estas células, mostrando que este estímulo activa la microglia. N=3-4 por grupo. Prueba de Tukey: \* $p<0.05$  vs. el correspondiente grupo Sal. Se grafica la media  $\pm$  EE.

#### IV.4.3 Comunicación periferia-SNC central

A partir de los resultados obtenidos podemos decir, en líneas generales, que las mayores diferencias en el SNC en nuestro modelo las observamos luego de un estímulo inflamatorio periférico, efecto que interpretamos como una respuesta exacerbada al LPS. Este aumento en la respuesta de los animales expuestos a VPA a nivel central podría generarse de dos maneras. O bien los componentes encargados de comunicar la respuesta inmune estarían, por alguna razón, más susceptibles de ser activados, o bien esos componentes ya estarían activados y, ante un estímulo, se activarían aún más, causando la respuesta exacerbada. Obviamente, estas dos opciones no son excluyentes y podrían darse de manera conjunta, potenciando aun más la respuesta a nivel central.

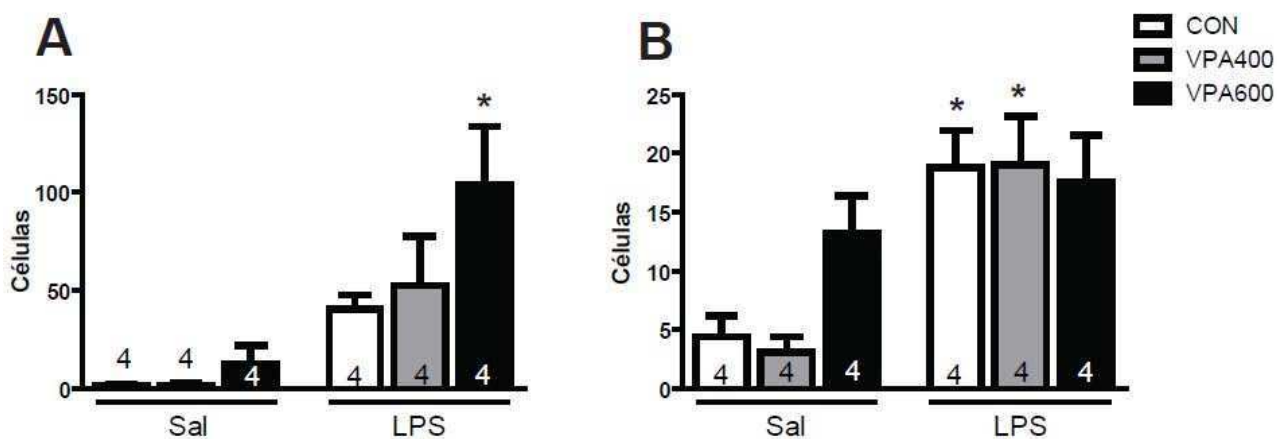
La información sobre una infección en la periferia es transmitida al SNC por diversos mecanismos. Las infecciones intraperitoneales clásicamente activan una vía visceral-sensorial que involucra principalmente al nervio vago y generan actividad neuronal en distintos núcleos en el cerebro. Una manera de saber si una neurona está activada es observando la expresión de proteínas que son factores de transcripción tempranos, por ejemplo la proteína c-fos (Gaykema et al., 1998; Konsman et al., 1999).



Luego de una infección intraperitoneal se ha visto un aumento en la expresión de c-fos en distintos núcleos, siendo el núcleo del tracto solitario (NTS) el núcleo de entrada. La activación de estas zonas en un tiempo adecuado lleva a ajustes en la homeostasis que le permiten al individuo luchar contra la infección de la mejor manera posible. Con el objetivo de evaluar la comunicación periferia-SNC, decidimos realizar una inmunohistoquímica anti c-fos a las dos horas del tratamiento adulto, estudiando la expresión de esta proteína en el NTS.

El análisis considerando tratamiento prenatal y tratamiento adulto mostró solo efecto del tratamiento adulto ( $F_{(1;18)}=20.625$ ;  $p=0.0002$ ). Sin embargo, si analizamos los resultados arrojados por la prueba de Tukey, vemos que la única diferencia entre grupos que alcanza significancia estadística es un aumento en el número de células que expresan c-fos en el grupo VPA600-LPS, con respecto al grupo expuesto VPA600-Sal (figura IV.21-A), lo que sugiere una mayor capacidad de respuesta por parte del grupo VPA600. Desde el NTS la información se distribuye hacia distintos núcleos. El más cercano es el núcleo parabraquial (PB), y decidimos evaluar este núcleo para ver si la respuesta se mantenía. El ANOVA nos muestra, como en el caso anterior, un efecto del tratamiento adulto ( $F_{(1;18)}=19.551$ ;  $p=0.0003$ ), pero a diferencia de lo observado en el NTS, la prueba de Tukey nos muestra un aumento estadísticamente significativo en los grupos CON-LPS y VPA400-LPS, respecto a sus controles inyectados con Sal (figura IV.21-B). No observamos diferencias entre los grupos VPA600-Sal y VPA600-LPS, y eso se debe a que el grupo VPA600-Sal muestra un alto número de células que expresan c-fos. Este resultado, sugiere que el grupo VPA600 tiene una activación del núcleo PB a nivel basal.

Estos resultados nos muestran al menos dos situaciones posibles: un aumento en la capacidad de responder ante un estímulo periférico y un estado pre-activado en condiciones basales, que podría ser parte de los síntomas que se observan en ausencia del estímulo.



**Figure IV.21. Los ratones expuestos a VPA mostraron diferencias en la expresión de c-fos en el NTS y en el PB.** El análisis del número de células que expresan c-fos en el NTS (A) y en el PB (B) mostró un efecto del tratamiento adulto. N, se muestra en cada barra. Prueba de Tukey: \*  $p < 0.05$  vs. el correspondiente grupo Sal.. Se grafica la media  $\pm$  EE. NTS: núcleo del tracto solitario. PB: núcleo parabraquial.

#### IV.5 Conclusiones

Por un lado, nosotros postulamos que la disfunción inmune sería el denominador común de las alteraciones observadas en el comportamiento. Por otro lado, el modelo de exposición al VPA en la F1 generada mostró las alteraciones comportamentales esperadas para un modelo de autismo. En esta línea de pensamiento, el paso siguiente era investigar si los animales expuestos a VPA prenatalmente mostraban una disfunción en el sistema inmune.

En un primer intento de evaluar el efecto del VPA prenatal sobre la respuesta inflamatoria, analizamos la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el bazo, un órgano linfoide importante. Se ha demostrado que niveles plasmáticos elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12p40 están asociados con comportamientos estereotipados más severos en pacientes con DEA (Ashwood et al., 2010). En contraposición, otros estudios muestran niveles normales de IL-6 y TNF- $\alpha$  en personas con este desorden (Croonenberghs et al., 2002). En nuestro modelo de ratón no pudimos detectar diferencias en los niveles basales de expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 o

TNF- $\alpha$ . La estimulación inflamatoria con 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS resultó en un aumento de la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el bazo 2 hs luego de la inyección en los animales controles, resultado esperado de acuerdo con un reporte previo que mostraba que la expresión de estas citoquinas en el bazo aumentan 2 hs luego de la inyección de LPS (Pitossi et al., 1997). Curiosamente, la expresión de IL-6 luego de la estimulación con LPS mostró niveles significativamente mayores de expresión en animales expuestos prenatalmente a VPA con respecto a los animales control. Estos resultados muestran similitud en términos generales con los reportes de actividad inmune innata en pacientes con DEA. Por ejemplo, se vio que monocitos de sangre periférica obtenidos de niños con DEA producen mayores niveles de citoquinas proinflamatorias al ser estimulados con los ligandos específicos de distintos receptores Toll: aumentan los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  al ser estimulados con LTA (que activa a los receptores Toll tipo 2), y aumentan los niveles de IL-1 $\beta$  al ser estimulados con LPS (que activa a los receptores Toll tipo 4), en relación a la respuesta de células obtenidas de niños control de edades similares (Enstrom et al., 2010). Resta por investigar si en este modelo en ratón también se observan patrones de respuesta diferentes a distintos estímulos inflamatorios.

También vimos que los animales adultos expuestos prenatalmente a VPA, muestran niveles plasmáticos de corticosterona normales. Esto está de acuerdo con diferentes estudios clínicos que muestran niveles normales de cortisol en niños y adultos con DEA (Corbett et al., 2006; Spratt et al., 2012). Sin embargo, el aumento de la concentración normal de esta hormona frente a un estímulo inflamatorio resulta significativamente mayor en animales VPA600, con respecto a los grupos CON y VPA400, lo que evidencia una hiperreactividad del eje HPA. Diferentes estudios dirigidos a caracterizar la respuesta HPA en niños y adultos con DEA muestran que los individuos con autismo tienen una respuesta elevada del eje HPA frente a estresores sociales y ambientales (Corbett et al., 2006; Spratt et al., 2012). Si bien esos estudios podían ser criticados, ya que el propio estímulo estresante (la exposición a un ambiente nuevo o la interacción con un individuo desconocido) podría tener distinto valor en individuos con DEA que en los individuos controles, la respuesta que vemos nosotros ante un

agente inflamatorio es similar y, al no representar un estímulo social o de novedad, sugiere que la respuesta exacerbada del eje HPA podría representar de hecho un síntoma del DEA.

Por otra parte, las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  son de especial interés en el estudio de las contribuciones neuroinmunológicas en trastornos psiquiátricos, ya que no sólo actúan localmente sino que también pueden aumentar la respuesta neuroinflamatoria y afectar el funcionamiento del cerebro. A fin de caracterizar mejor el estado inflamatorio central basal y la respuesta a un estímulo periférico, analizamos la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , y de la citoquina anti-inflamatoria TGF- $\beta$ 1, en tres regiones del cerebro relevantes para el autismo: cerebelo, hipocampo y corteza. En línea con lo observado para la periferia, no encontramos diferencias entre los grupos a nivel basal en cuanto a la expresión de las citoquinas analizadas. Sorprendentemente, encontramos diferentes patrones de expresión luego del estímulo inflamatorio para cada una de las citoquinas analizadas. La expresión de IL-1 $\beta$  mostró una tendencia a aumentar en el cerebelo y un aumento significativo en la corteza de ratones VPA600 expuestos a LPS. La expresión de IL-6 aumentó en las 3 regiones luego del LPS tanto en los animales CON, VPA400 y VPA600, pero este aumento fue significativamente mayor en el cerebelo y en la corteza de los ratones VPA600. Con respecto a la expresión de TNF- $\alpha$ , ésta también se vio aumentada después de la inyección de LPS en las 3 regiones del cerebro, aunque el comportamiento fue distinto en cada región: en el cerebelo, el aumento después del estímulo fue significativamente mayor en los animales VPA600; en hipocampo, los animales VPA400 y VPA600 mostraron un aumento menor que los animales CON; y en corteza, los 3 grupos mostraron un aumento similar en la expresión de esta citoquina. Por último, no observamos cambios en los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 en ningún grupo experimental. Previamente en el laboratorio hemos demostrado un efecto diferencial de TGF- $\beta$ 1 en comportamientos relacionados con el autismo, dependiendo de si esta citoquina se sobreexpresa en el hipocampo joven o adulto (Depino et al., 2011). En línea con esto, sería relevante a futuro evaluar si en este modelo

la expresión de esta citoquina (junto con otras) se encuentra alterada postnatalmente, y si un estado neuroinflamatorio temprano también contribuye a las alteraciones en el comportamiento observadas en este modelo.

Las diferencias observadas en la expresión de citoquinas entre las distintas zonas del cerebro tras la estimulación con LPS podrían explicarse por el hecho de haber tomado un solo punto temporal después de la inyección. Un estudio previo ha demostrado que los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  tienen diferentes curvas de expresión en diferentes regiones del cerebro (Pitossi et al., 1997). A pesar de esto, podemos observar una clara respuesta exacerbada en la expresión de citoquinas en el cerebelo y, en menor medida, en la corteza.

Para seguir caracterizando la respuesta inflamatoria central, decidimos evaluar el efecto de la exposición prenatal al VPA sobre las células gliales tanto a nivel basal como después de un estímulo inflamatorio periférico. Para alcanzar ese objetivo, analizamos la densidad de células de la microglia y el porcentaje de área ocupada por células de la astrogliosis en las mismas tres regiones mencionadas anteriormente. El VPA causó un aumento en la densidad de las células de la microglia en el cerebelo y en la región CA1 del hipocampo. Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia de un efecto a largo plazo del VPA sobre las células de la microglia. Una posible explicación sería que la exposición prenatal a VPA podría estar alterando la proliferación de las células de la microglia y/o favoreciendo la migración de los monocitos circulantes hacia el parénquima cerebral en estas regiones. Alternativamente, el aumento que observamos en la adultez podría deberse a un mecanismo de compensación disparado por una disminución de células de la microglia en la etapa prenatal, en número, en funcionalidad o en ambas. En línea con esta hipótesis, estudios *in vitro* indican que el VPA promueve la proliferación de astrocitos e inhibe la activación de microglia y de macrófagos, induciendo además apoptosis de la microglia (Peng et al., 2005; Dragunow et al., 2006). En el laboratorio estamos investigando qué ocurre en cuanto a la neuroinflamación a edades

tempranas para poder discernir cuál de los dos escenarios es el que está causando el aumento de microglia en la adultez.

Además quisimos ver si la respuesta inflamatoria evidenciada por la alteración del perfil de expresión de citoquinas después de una inyección de LPS tanto en la periferia como en el SNC tenía algún correlato en la respuesta de las células gliales. Por un lado, en el cerebelo el LPS causó un aumento en la densidad de células de la microglia en ratones CON a niveles similares a los de los ratones VPA600 no estimulados. Sin embargo, la falta de detección de una respuesta exacerbada en ratones VPA600 en esta región podría deberse a un efecto techo, ya que en ninguna situación observamos una mayor densidad de microglia. Sin embargo, el aumento en el tamaño de los somas de estas células en el cerebelo de ratones VPA600 sugiere una mayor activación de la microglia luego del estímulo de LPS. En el hipocampo, encontramos más microglia en la capa molecular y en el hilus del giro dentado y en la región CA1 en ratones VPA600 que en ratones CON, luego del estímulo de LPS, lo que sugiere nuevamente una respuesta exacerbada. Por otra parte, vimos que el tratamiento adulto tuvo un efecto sobre el tamaño de los somas de la microglia en las 3 regiones analizadas, sugiriendo cierto grado de activación de estas células luego de un estímulo inflamatorio periférico, en línea con lo reportado previamente (Graciarena et al., 2013). El área ocupada por los astrocitos, por otro lado, no mostró el patrón claro de activación esperado en función de los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de citoquinas. El resultado más relevante es el aumento en el área ocupada por los astrocitos en la capa de células granulares del lóbulo VII en los ratones VPA400 y VPA600. Trabajos previos han vinculado las alteraciones en el desarrollo normal de este lóbulo con la reducción de la sociabilidad en el ratón (DeLorey et al., 2008; Shi et al., 2009).

Los resultados de este capítulo están de acuerdo con distintos análisis *post-mortem* que muestran activación tanto de la microglia (Vargas et al., 2005; Morgan et al., 2010) como de la astrogliosis (Vargas et al., 2005) en distintas regiones del cerebro autista, y apoyan a la exposición prenatal de ratones a VPA como un modelo valioso para evaluar el desarrollo de la

activación glial y su contribución a las alteraciones comportamentales observadas en DEA. Además, las alteraciones en la respuesta inflamatoria periférica sugieren que las alteraciones similares observadas en los pacientes con DEA podrían representar endofenotipos o síntomas relevantes al desorden. Los resultados de esta tesis le agregan entonces valor al modelo de VPA como una herramienta útil para evaluar los mecanismos mediante los cuales la respuesta inmune y la conducta pueden modularse en el contexto del DEA.

## Capítulo V- Resultados

---

Relaciones entre el fenotipo comportamental, la presencia de neuroinflamación y la respuesta exacerbada del eje HPA.



## V.1 Punto de inicio

Los resultados presentados en los capítulos anteriores muestran que existe una co-ocurrencia de fenotipos comportamentales y alteraciones en el eje HPA y en la respuesta inflamatoria, tanto a nivel periférico como a nivel central. Nuestros resultados aportan así a otros trabajos publicados. En base a estas evidencias nos preguntamos si esta co-ocurrencia es solo eso, fenotipos que se desencadenan de manera paralela en respuesta al VPA (o, en el caso del DEA, a un factor etiológico desconocido de la enfermedad), o si existe alguna relación causa-efecto entre el comportamiento y las alteraciones observadas.

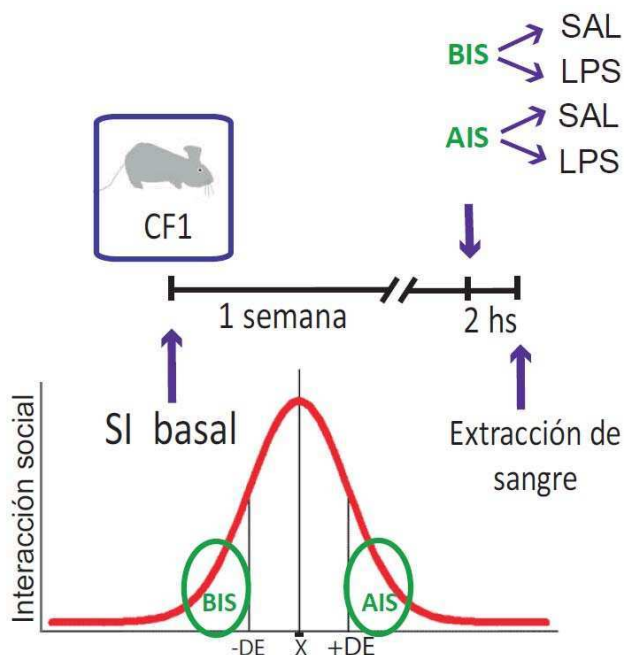
El objetivo de los experimentos que se presentan en este capítulo, por lo tanto, fue estudiar las posibles relaciones entre el fenotipo comportamental, la presencia de neuroinflamación y la respuesta exacerbada del eje HPA. Para esto, llevamos adelante dos abordajes: un estudio correlacional y una prueba de concepto.

## V.2 Análisis correlacional

Los resultados obtenidos en el capítulo IV muestran que la respuesta del eje HPA ante un estímulo inflamatorio se encuentra exacerbada en los animales VPA600. Es decir que los animales que muestran una baja interacción social tienen una respuesta de corticosterona elevada ante un estímulo inflamatorio. Nos preguntamos si estos dos efectos podrían deberse a alteraciones en un mismo sustrato biológico o ser uno causa del otro. Razonamos que, si esto fuera así, deberíamos encontrar esta co-ocurrencia en la población natural, es decir, poblaciones que difieren naturalmente en los niveles de interacción social deberían variar también en la respuesta del eje HPA ante un estímulo inflamatorio.

En base a este razonamiento, diseñamos el experimento que se muestra en la figura V.1. A diferencia de los animales de los capítulos anteriores, que eran F1 de cruce de las cepas endocriadas C57 y Balb/c, utilizamos en estos experimentos ratones machos de la cepa exocriada CrIFcen:CF1 (CF1). Razonamos que siendo una cepa exocriada, los animales CF1 mostrarían una mayor variabilidad en la conducta que las cepas endocriadas.

Realizamos el ensayo de interacción social a un total de 90 ratones machos adultos de la cepa CF1 y seleccionamos dos grupos. Uno de los grupos fue el de los animales cuyo tiempo de interacción social fue menor a la media menos un desvío estándar, a este grupo lo llamamos grupo de *baja interacción social* (BIS). El otro grupo fue el de los animales cuyo tiempo de interacción social era mayor a la media más un desvío estándar, a este grupo lo denominamos grupo de *alta interacción social* (AIS). Luego de una semana, inyectamos aleatoriamente a los animales de cada grupo con solución salina o LPS. Y, al igual que lo realizado en el experimento del capítulo IV, a las dos horas les extrajimos sangre para realizar un RIA a fin de medir los niveles de corticosterona en plasma.

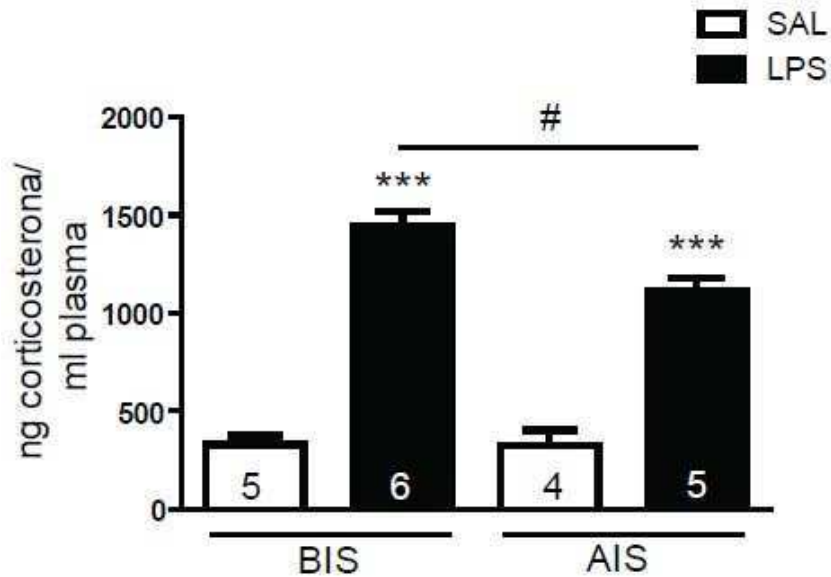


**Figura V.1. Diseño experimental.**

Luego de un ensayo de interacción social clasificamos a los animales como animales de baja interacción social (BIS) y de alta interacción social (AIS). Cada grupo fue inyectado con salina o LPS. A las dos horas se anestesiaron los animales y se les extrajo sangre para luego medir los niveles de corticosterona en plasma. X: media, DE: Desvío estándar, SI: ensayo de interacción social.

Los factores considerados entonces fueron tipo de interacción social (BIS o AIS) y estímulo inflamatorio (SAL o LPS). El ANOVA de dos factores

mostró una interacción significativa entre estos factores ( $F_{(1,16)}=5.702$ ,  $p=0.029$ ): el LPS tiene efecto en los dos grupos, causando un aumento en los niveles de corticosterona, pero el efecto varía según los niveles de interacción social que muestran los animales, siendo el grupo de baja interacción social el que desencadena una mayor respuesta del eje HPA (figura V.2).



**Figura V.2. Efecto del LPS periférico sobre dos poblaciones naturalmente distintas en su interacción social.** Todos los animales mostraron un aumento en los niveles de corticosterona 2 horas después de la inyección de LPS, pero este aumento fue mayor en los animales de baja interacción social. N, en cada barra. Prueba de Tukey: \*  $p<0.001$  vs el correspondiente grupo SAL; #  $p<0.05$ . Se grafica la media  $\pm$  EE.

### V.3 Prueba de concepto

Una prueba de concepto es una implementación, a menudo resumida o incompleta, de una idea o de un proceso, realizada con el propósito de verificar que el concepto o hipótesis en cuestión es susceptible de ser cierto. En este caso, la idea que queremos evaluar es que la neuroinflamación es la causa de una disminución en la interacción social, es decir, que subyace al comportamiento observado.

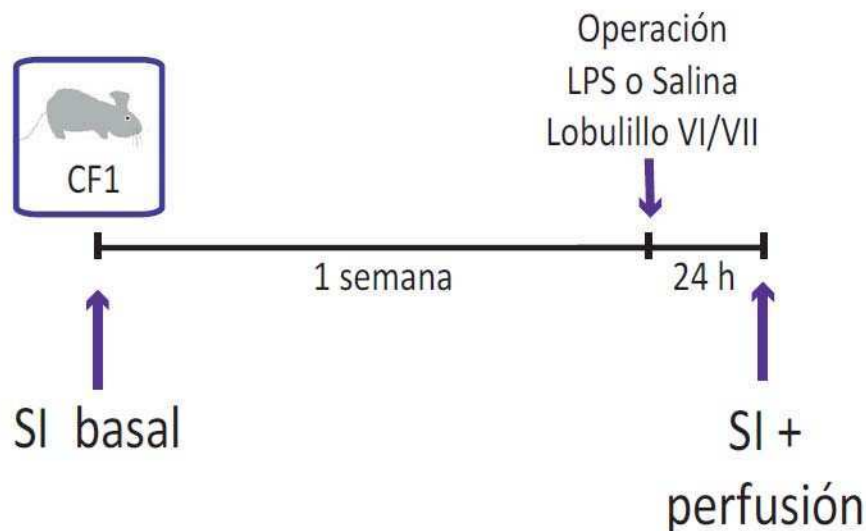
Para evaluar esto tuvimos en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, en particular que a nivel basal (sin el estímulo inflamatorio) las diferencias encontradas fueron observadas principalmente en el cerebelo: un aumento en la densidad de células de la microglia y un aumento en el porcentaje de área marcada con GFAP en el lobulillo VI/VII. Decidimos afectar específicamente esa zona y ver cuál era el efecto de un estímulo inflamatorio aplicado a nivel del sistema nervioso central sobre el comportamiento social.

### *V.3.1 Diseño Experimental*

Los animales usados en este diseño experimental fueron los que no utilizamos en el diseño anterior, aquellos cuyos valores de interacción social eran mayores a la media menos un desvío estándar y menores a la media más un desvío estándar (mirando la figura V.1, vemos que son los más centrales en la campana de distribución de la variable interacción social). De este modo, contamos con tres ventajas en el diseño: 1) los ratones utilizados tienen niveles de interacción más similares que partiendo de la población total de ratones de la cepa CF1 del bioterio; 2) como conocemos el valor basal de interacción social de cada ratón, la distribución en grupos no fue aleatoria, sino que fueron distribuidos de modo de nivelar los grupos; y 3) como tenemos el valor basal, podemos relativizar los resultados con respecto a la interacción social del mismo ratón previo al tratamiento.

Una semana más tarde de la evaluación de los niveles de sociabilidad realizamos la operación de estos animales, inyectándoles LPS o solución salina en el cerebelo, específicamente en el lobulillo VI/VII. Hicimos la inyección en esa zona debido a que algunos grupos han mostrado la relevancia del lobulillo VII del cerebelo en la determinación de los niveles de sociabilidad en el ratón (DeLorey et al., 2008) y nosotros observamos diferencias en el porcentaje de área marcada con GFAP. La inyección de 0.1 µg de LPS en 1 µl de solución salina o el mismo volumen de solución salina fue realizada con ayuda de un marco estereotáxico. Luego de que los animales se recuperaron de la anestesia, fueron devueltos a su jaula y a su

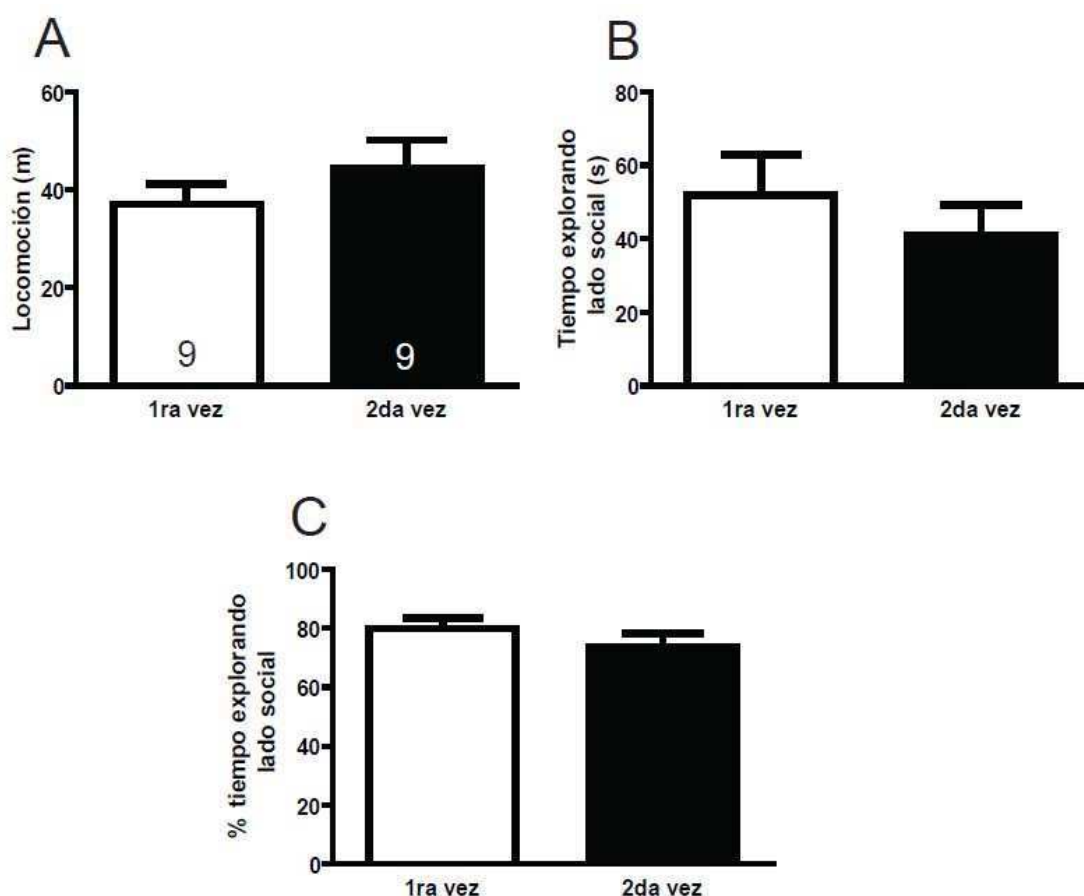
sala en el bioterio y 24 horas más tarde evaluamos su interacción social, como se indica en la figura V.3.



**Figura V.3. Diseño experimental usado en esta sección.** Usamos ratones naive adultos de la cepa CF1. La inyección fue realizada por medio de una operación estereotáxica específicamente en el lobulillo VI/VII. A las 24 horas de la operación se realizó el ensayo de interacción social y al terminar de evaluar a todos los animales, se los perfundió. Se extrajo el cerebelo, que posteriormente fue usado para histología. SI: ensayo de interacción social.

### V.3.2 Efecto de la exposición repetida al ensayo de interacción social.

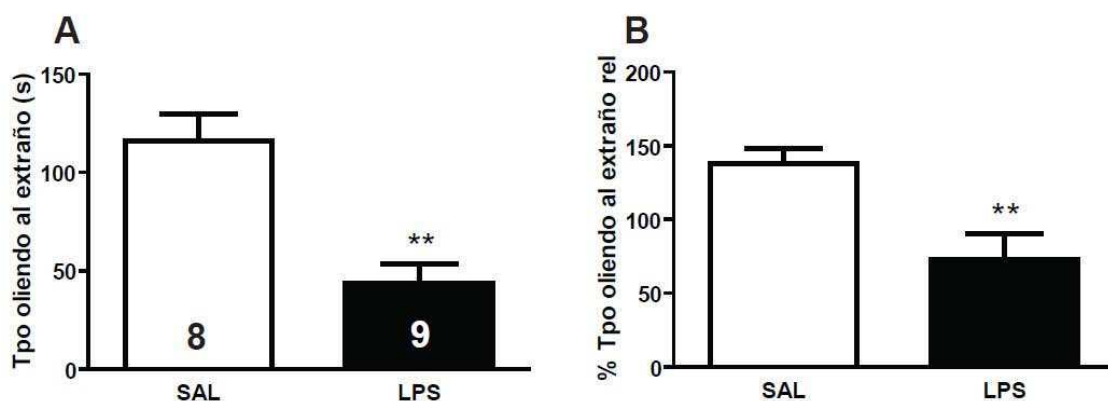
Para descartar cualquier factor de confusión por el hecho de exponer a los animales dos veces al ensayo de interacción social, llevamos adelante un experimento independiente en el que evaluamos el tiempo que los animales exploran el lado social la primera vez que son expuestos a este ensayo con respecto a la segunda vez (experimentos distanciados 1 semana). Los animales usados fueron animales del mismo sexo, misma cepa y misma edad que los inyectados en el cerebelo. No vimos diferencias en cuanto a la locomoción durante la habituación en el ensayo (figura V.4-A), en el tiempo absoluto que los animales están explorando al estímulo social (figura V.4-B), y el porcentaje de tiempo que pasan explorando al estímulo social con respecto al tiempo total de exploración entre la primera y la segunda vez que son expuestos son similares (figura V.4-C). Este resultado muestra que la exposición previa a un ensayo de interacción social no altera los niveles de exploración o de interacción cuando el ensayo se repite 7 días después.



**Figura V.4. Efecto de la exposición repetida al ensayo de interacción social.** No se observaron diferencias en la locomoción en la fase de habituación entre la primera y la segunda vez que fueron expuestos (**A**) como tampoco en el tiempo (**B**) o el porcentaje de tiempo que los animales pasaron explorando el lado social con respecto al tiempo total de exploración (**C**). N, en cada barra. Prueba de t pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE.

### V.3.3 Efecto de la inyección de LPS sobre la interacción social.

A las 24 horas de la operación evaluamos la interacción social de los animales. Los animales inyectados con LPS en el lobulillo VI/VII del cerebelo mostraron una disminución en el tiempo que pasan oliendo al ratón extraño tanto en términos absolutos ( $t_{(15)}=4.273$ ,  $p=0.001$ ; figura V.5-A) como al relativizar el tiempo oliendo al extraño con respecto a la interacción basal cuantificada la semana anterior (figura V.5-B). La comparación con los niveles de la semana anterior nos permite descartar que el someter a los animales a una operación (con anestesia y recuperación) resulte en una disminución en la interacción social.

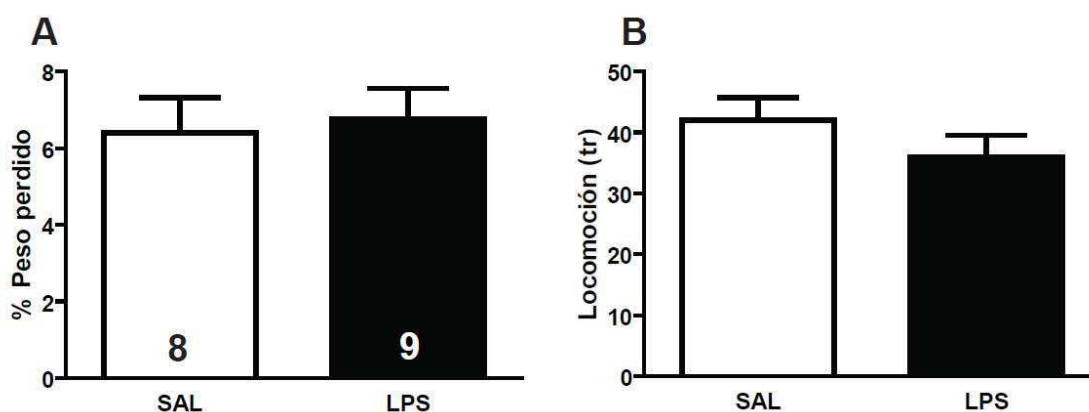


**Figura V.5. Efecto de la inyección de LPS en el lobulillo VI/VII del cerebelo sobre la interacción social.** Los ratones inyectados con LPS intracerebelarmente en el lobulillo VI/VII (LPS) pasaron menos tiempo oliendo al ratón extraño que los inyectados con solución salina (SAL). Este tiempo es menor tanto al mirar los valores absolutos (A) como al comparar los valores relativos al tiempo que pasaron esos mismos animales en el ensayo de interacción social basal (B). N, en cada barra. Prueba de t no pareada: \*\*  $p < 0.01$ . Se grafica la media  $\pm$  EE.

Según nuestra hipótesis, el estímulo inflamatorio estaría generando una respuesta en el tejido que sería la responsable del cambio en el comportamiento social, lo que explicaría (al menos en parte) nuestros resultados en el modelo VPA.

Al pensar en una inyección central de LPS no podemos ignorar lo que se conoce como comportamiento relacionado a la enfermedad o *sickness behavior* (en inglés). Este comportamiento comprende una disminución en la exploración tanto social como del ambiente, una disminución en la actividad locomotora y pérdida de peso, causada por una disminución en la ingesta de agua y comida. Esto ha sido extensivamente estudiado y se ha visto que tanto inyecciones sistémicas como en regiones específicas del sistema nervioso central (por ejemplo en el hipotálamo) de citoquinas o de moléculas que inducen la síntesis de citoquinas (como el LPS), inducen todo el abanico de respuestas mencionado, tanto en humanos como en modelos animales (Kent et al., 1992; Dantzer et al., 2008). Por todo esto, la disminución en la interacción social observada podría ser una de las respuestas comportamentales desplegadas en el contexto del comportamiento relacionado con la enfermedad.

Para poder discernir entre un efecto de tipo *sickness behavior* y una disminución específica en la interacción social a partir de la inyección de LPS en el cerebelo, decidimos evaluar las otras características que acompañan a la disminución en la interacción social en el comportamiento relacionado con la enfermedad: pérdida de peso y disminución de la actividad locomotora. Pesamos a los animales inmediatamente antes de la operación e inmediatamente después del ensayo comportamental y comparamos la pérdida de peso entre el grupo de animales inyectados con salina (grupo SAL) y el inyectado con LPS (grupo LPS). Vimos que los dos grupos perdieron peso, resultado esperado ya que ambos grupos sufrieron una cirugía, pero esta pérdida era similar en los dos grupos (figura V.6-A). Además, analizamos la locomoción en la fase de habituación del test de interacción social, fase en la que no se encuentra presente el estímulo social. No encontramos diferencias entre los niveles de locomoción de ambos grupos (figura V.6-B). Estos dos resultados descartan la posibilidad de que los efectos observados sobre la interacción social se deban al comportamiento relacionado con la enfermedad, y apoyan nuestra hipótesis de una relación causa-efecto entre la inflamación del cerebelo y un cambio en el comportamiento social.

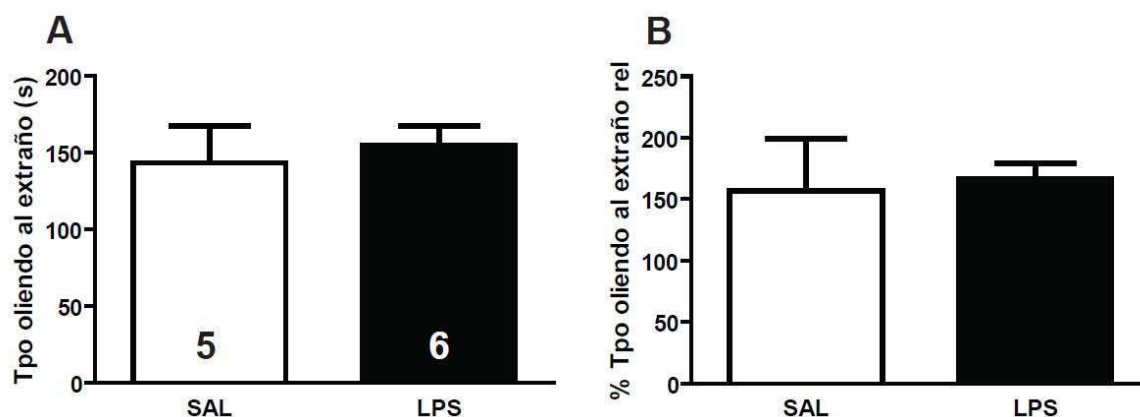


**Figura V.6. Efectos de la inyección de LPS en el lobulillo VI/VII del cerebelo sobre la pérdida de peso y la locomoción.** Los ratones inyectados con LPS intracerebelarmente en el lobulillo VI/VII perdieron peso del mismo modo que los inyectados con salina (A). También mostraron los mismos niveles de locomoción general en la fase de habituación del ensayo de interacción social (B). N, en cada barra. Prueba de t no pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE. tr: transiciones.



También nos preguntamos si la disminución en la interacción social era un resultado específico de la neuroinflamación en el lobulillo inyectado o era un resultado general para cualquier otra zona del cerebelo. Para evaluar esto llevamos adelante el mismo diseño experimental modificando sólo el sitio de inyección: la inyección de SAL o LPS fue efectuada en el lobulillo IV/V. Es importante mencionar que estos lobulillos, a pesar de ser contiguos, tienen diferentes orígenes embriológicos y se comunican con distintas zonas del cerebro (retomaremos esto en la discusión).

Al realizar el ensayo de interacción social 24 horas luego de la operación, no observamos diferencias entre los animales inyectados con SAL o con LPS en el lobulillo IV/V en el tiempo que pasan oliendo al extraño ( $t_{(9)}=0.4490$ ,  $p=0.640$ ; figura V.7-A). Tampoco observamos diferencias al comparar el porcentaje de tiempo que los animales pasaron oliendo al extraño relativo a sí mismos antes de la operación ( $U=13$ ,  $p=0.792$ ; figura V.7-B). Al analizar la locomoción y la pérdida de peso tampoco vimos diferencias (locomoción, grupo SAL:  $38.0\pm 4.4$  transiciones, grupo LPS:  $46\pm 5$  transiciones,  $t_{(9)}=1.172$ ,  $p=0.271$ ; porcentaje de peso perdido, grupo SAL:  $3.63\pm 1.98$  %, grupo LPS:  $2.60\pm 1.97$  %,  $t_{(9)}=0.352$ ,  $p=0.773$ ).

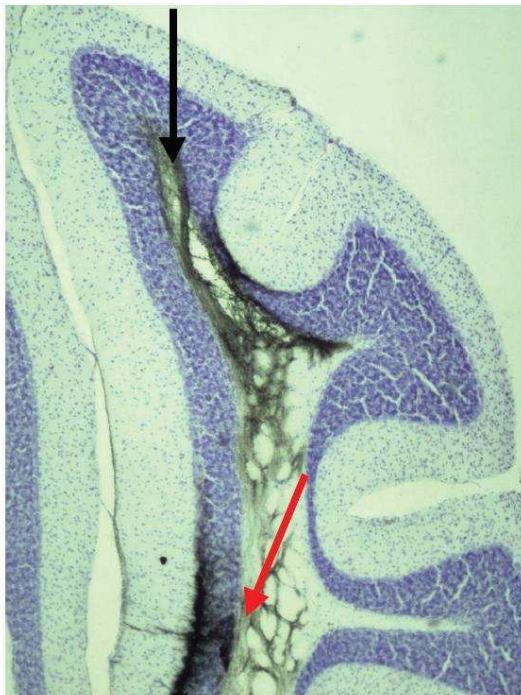


**Figura V.7. Efecto de la inyección de LPS en el lobulillo IV/V del cerebelo sobre la interacción social.** Los ratones inyectados con LPS intracerebelarmente en el lobulillo IV/V pasaron el mismo tiempo interactuando con el ratón extraño que los inyectados con salina. No se observaron diferencias ni en los valores absolutos (A) ni en los valores relativos al tiempo que pasaron esos mismos animales en el ensayo de interacción social basal (B). N, se muestra en cada barra. Prueba de t no pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE.

#### V.3.4 Efecto del LPS sobre el tejido cerebelar.

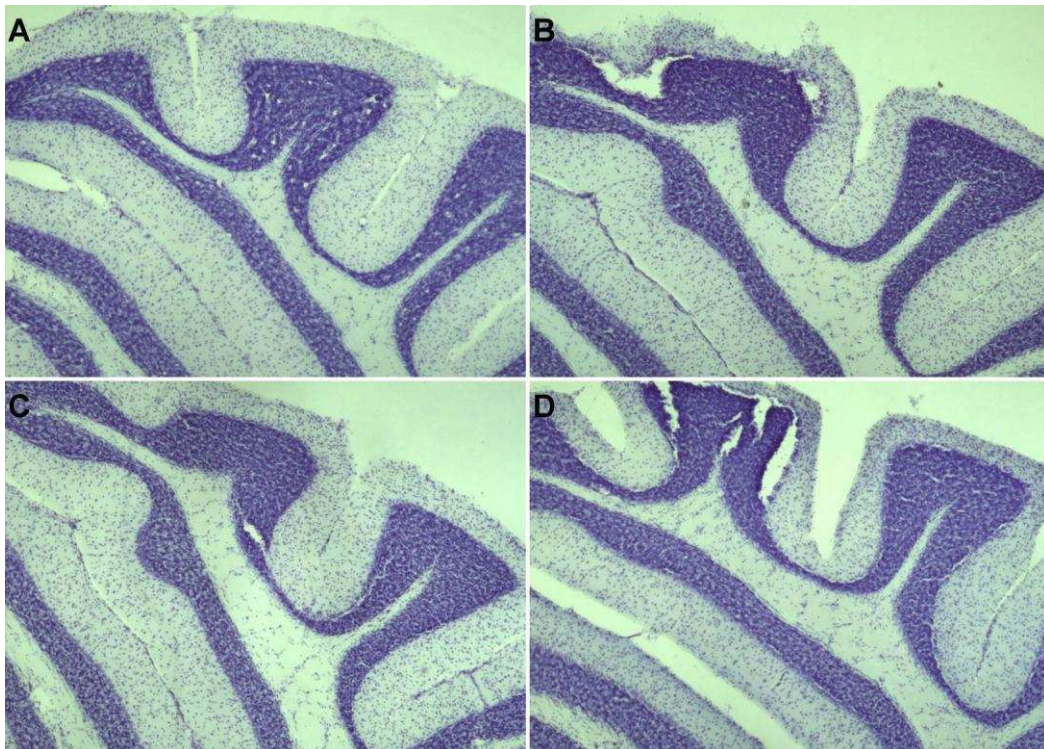
El LPS es un estímulo inflamatorio que, a nivel central, estimula la expresión de citoquinas y la activación glial (Quan et al., 1994; Hauss-Wegrzyniak et al., 1998; Huang et al., 2008). Hasta el momento se ha descrito el efecto de la inyección de LPS intracerebroventricular (Lawson et al., 2013), en el hipocampo (Ahmadi et al., 2013) y en la amígdala (Akhlaghi et al., 2012), pero, según nuestro conocimiento, no se ha descrito el efecto de esta inyección sobre el tejido nervioso del cerebelo. Por esta razón, decidimos evaluar las respuestas tisulares en el lobulillo inyectado (posible neurodegeneración, activación glial, infiltración de células inmunes de la periferia, etc).

Para estudiar el estado del tejido, 2 horas después de evaluar la interacción social, los animales fueron perfundidos y los cerebelos extraídos, congelados y cortados a fin de realizar tinciones de Nissl e inmunohistoquímicas. En la mayoría de los casos observamos que la entrada del capilar fue sobre el lobulillo VI (este fue el lobulillo más lastimado) y el sitio de inyección se localizó en la zona en la que se bifurcan los lobulillos VI y VII (figura V.8).



**Figura V.8. Inyección de tinta china en el lobulillo VI/VII.** La inyección entra por el lobulillo VI (flecha negra), el capilar llega hasta el lugar donde se bifurcan los lobulillos VI y VII, y lo inyectado se distribuye entre ambos lobulillos (flecha roja).

Al analizar el estado del lobulillo VII vimos en algunos casos la capa granular ligeramente desorganizada, despegada de la capa molecular y la presencia de vasos dilatados. Esto no se vio en todos los cortes, sino en los más centrales. No observamos diferencia entre los cerebelos inyectados con salina y los inyectados con LPS: encontramos una gran variabilidad entre todos los animales, independientemente del tratamiento recibido (figura V.9).

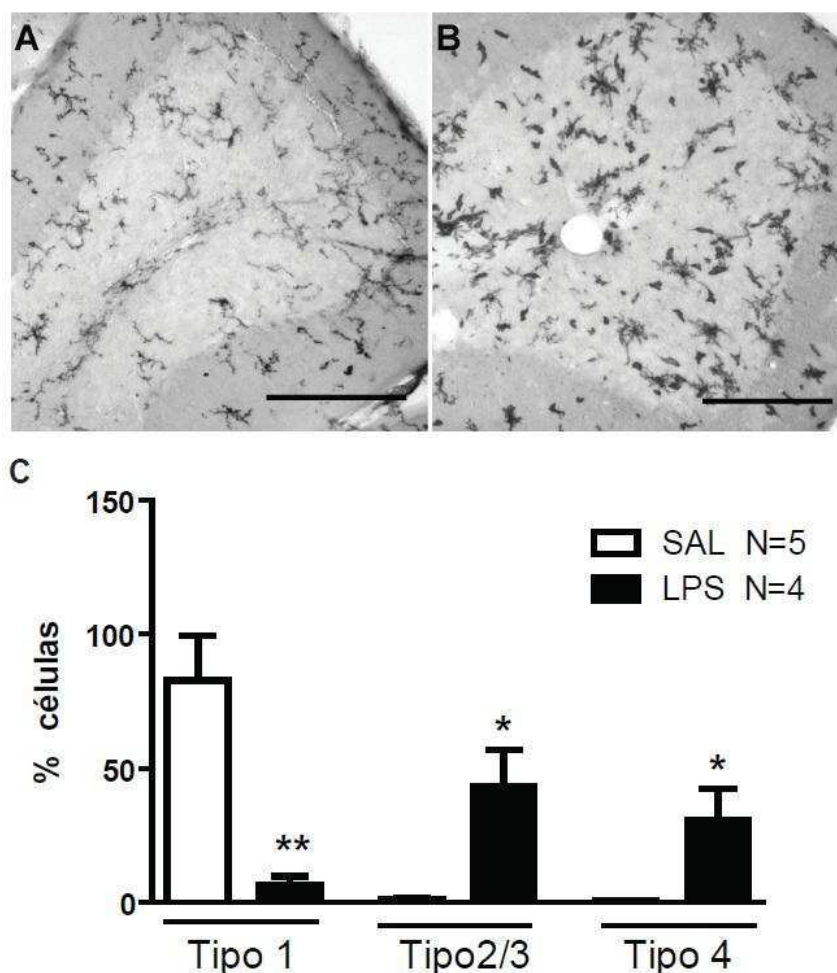


**Figura V.9. Efecto de la inyección de LPS sobre el tejido cerebelar.** Imágenes de tinciones de Nissl de cerebelos inyectados con SAL (A y B) o con LPS (C y D). Se muestran los cerebelos de 2 animales distintos de cada grupo. Puede observarse la variabilidad en el efecto de la inyección tanto de SAL como de LPS sobre la organización del tejido.

Para estudiar el estado de activación de la microglia, realizamos inmunohistoquímicas anti-CD11b y, a diferencia de lo observado en el capítulo anterior, vimos células en distintos estadios de activación, razón por la que decidimos evaluar el porcentaje de células en cada estadio en lugar de calcular la densidad. En cada corte observamos un gradiente en los niveles de activación de las células: un gran número de células activadas cerca del sitio de inyección, con una marca nítida e intensa y una

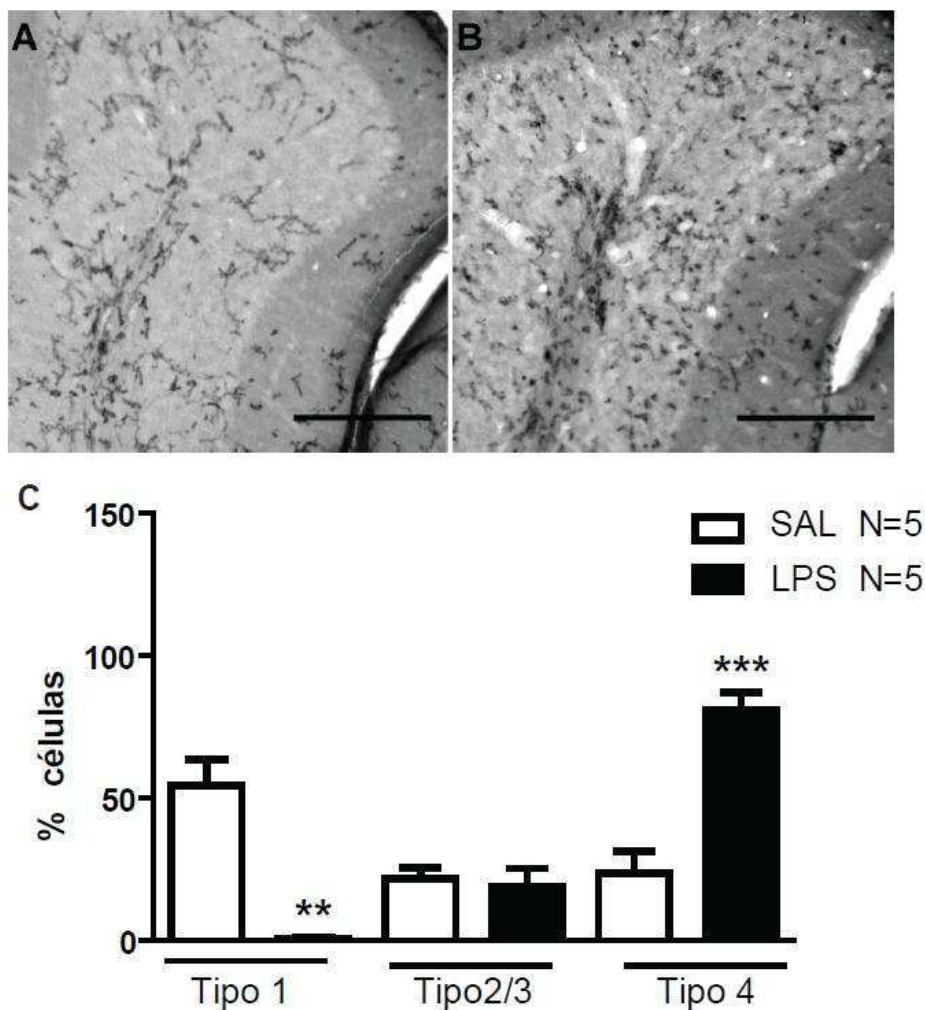
disminución en el grado de activación y en la intensidad de la marca en las zonas más alejadas. A raíz de esto, decidimos cuantificar y clasificar solo en la zona cercana a la inyección, de modo de no diluir la diferencia en caso de que la hubiera.

El análisis de los distintos estados morfológicos de la microglia en el lobulillo VI/VII mostró una extensa microgliosis en los cerebelos de los ratones inyectados con LPS comparado con los inyectados con Sal (figura V.10-A y B), que se evidenció como un aumento en el porcentaje de células en estadios más avanzados (tipo 2/3 y tipo 4) (figura V.10-C).



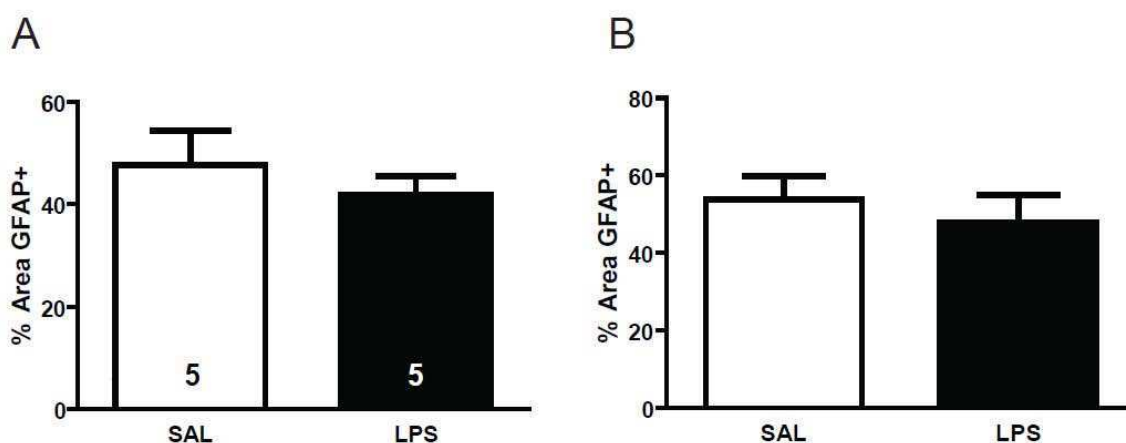
**Figura V.10. Efecto de la inyección de LPS en el cerebelo sobre la activación de la microglia en el lobulillo VI/VII.** Los ratones inyectados con salina en el lobulillo VI/VII del cerebelo mostraron la mayoría de las células en estado de reposo (A), mientras que los inyectados con LPS mostraron la presencia de células en distintos estados de activación (B). Se cuantificaron y clasificaron los tipos celulares y se muestra el porcentaje de cada uno de ellos (C). N, en el gráfico. Prueba de t no pareada (Tipo 1) o prueba de Mann-Whitney (Tipo 2/3 y Tipo 4): \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se grafica la media  $\pm$  EE.

Realizamos este análisis de la microglia en los animales inyectados en el lobulillo IV/V del vermis cerebelar. En este caso también observamos un aumento en la proporción de microglia activada en los cerebelos de los ratones inyectados con LPS (figura V.11-A y B), que se evidenció como un aumento en el porcentaje de células en estadios más avanzados (tipo 4) (figura V.11-C). De hecho el porcentaje de células con morfología del tipo fagocítica fue notablemente mayor en los animales inyectados con LPS en el lobulillo IV/V.



**Figura V.11. Efecto de la inyección de LPS en el cerebelo sobre la activación de la microglia en el lobulillo IV/V.** Los ratones inyectados con salina intracerebelarmente en el lobulillo IV/V mostraron distintos estadios de activación de las células de la microglia (A), mientras que los inyectados con LPS mostraron un mayor número de células tipo 4 (B). Luego de cuantificar y clasificar a los tipos celulares, se observó un mayor porcentaje de células con estadios más activados en el grupo LPS (C). N, en el gráfico. Prueba de Mann-Whitney (Tipo 1) o prueba de t no pareada (Tipo 2/3 y Tipo 4): \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Se grafica la media  $\pm$  EE.

Para evaluar la astroglia, realizamos inmunohistoquímicas anti-GFAP y analizamos las imágenes de las secciones del mismo modo que en el capítulo anterior, comparando el porcentaje de área marcada. No encontramos diferencia en esta variable al cuantificar tanto en la capa molecular (figura V.12-A) como en la granular del lobulillo VII (figura V.12-B). Como no encontramos diferencia en esta variable en este lobulillo, decidimos no evaluarla luego de inyectar en el lobulillo IV/V.



**Figura V.12. Efecto de la inyección de LPS sobre la activación de la astroglia.** Los ratones inyectados con SAL intracerebelarmente en el lobulillo VI/VII mostraron el mismo porcentaje de área marcada con GFAP que los inyectados con LPS, tanto en la capa molecular (**A**) como en la granular (**B**) del lobulillo VII. N, en cada barra. Prueba de t no pareada. Se grafica la media  $\pm$  EE para cada grupo.

#### V.4 Conclusiones

En base a los resultados presentados en este capítulo podemos generar nuevas hipótesis de trabajo tendientes a comprender cómo la exposición prenatal al VPA resulta en las alteraciones en la conducta y en la respuesta inflamatoria observadas en los capítulos precedentes.

Con respecto al estudio correlacional, en el capítulo IV hemos visto que los animales expuestos a VPA mostraban una respuesta exacerbada del eje HPA ante un estímulo inflamatorio de LPS y en el capítulo III mostramos una disminución en los niveles de interacción social en los mismos animales.

Estos dos eventos podrían estar o no estar relacionados. El estudio de grupos que difieren naturalmente en los niveles de interacción social en una cepa exocriada como la CF1 y la respuesta del eje HPA observada en cada grupo, de hecho sugiere que ambos eventos están relacionados, posiblemente compartiendo un sustrato biológico. Los animales de AIS muestran una determinada respuesta del eje HPA ante el estímulo de LPS, mientras que los de BIS muestran, ante el mismo estímulo, una respuesta mayor.

Encontramos similares resultados en los trabajos que evalúan la correlación entre el cuidado materno recibido posnatalmente y la posterior respuesta a estrés de las crías, tanto en la activación del eje HPA (Liu et al., 1997) como en la conducta (Caldji et al., 1998). Utilizando ratas de la cepa exocriada Long-Evans (CrI:LE), el grupo dirigido por el Dr. Michael Meaney (Universidad de McGill, Montreal, Canadá) demostró que existen variaciones naturales en cuanto a la calidad y cantidad de cuidado que las madres prodigan a sus crías. Teniendo en cuenta la diferencia natural en el cuidado materno, clasificaron a los animales en "poco cuidados" o "muy cuidados" por sus madres (Champagne et al., 2003). Al analizar a las crías observaron que, independientemente del cuidado recibido, todos los animales mostraban niveles basales de corticosterona similares pero que, ante un estímulo estresante, el aumento en los niveles de corticosterona del grupo de los poco cuidados era mayor que el observado en el grupo de los muy cuidados (Liu et al., 1997). De manera similar, los animales poco cuidados mostraban una mayor respuesta de miedo (Caldji et al., 1998). Posteriores estudios del grupo mostraron que la diferencia en la respuesta del eje HPA está dada por las diferencias en la expresión de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo (Weaver et al., 2001), y que eso se debe a modificaciones epigenéticas causadas por menores niveles de serotonina en el grupo de los animales poco cuidados (Milbrandt, 1987; McCormick et al., 2000; Weaver et al., 2004a; Weaver et al., 2004b).

Nuestro análisis correlacional sugiere que el comportamiento social correlaciona con los niveles de respuesta del eje HPA frente a un estímulo inflamatorio. Al momento de esta presentación no sabemos si existe un

mecanismo biológico común a ambos procesos, pero hipotetizamos que podría ser el mismo mecanismo epigenético descrito para los animales "poco cuidados". Podemos hipotetizar además que el VPA actúa sobre este mecanismo, hipótesis que se encuentra apoyada por el hecho de que se han encontrado menores niveles de serotonina en el modelo de VPA (Dufour-Rainfray et al., 2010), sumado a que el modelo de VPA es generado por un agente inhibidor de deacetilasas de histonas, capaz de modificar el estado epigenético de las células. Interesantemente, se ha visto que la programación del comportamiento y del eje HPA, evento que ocurre temprano en la vida de los animales y por medio de procesos epigenéticos, es susceptible de ser revertido: la inyección de S-adenosil-metionina, que funciona como un dador de grupos metilos para la metilación del ADN, revierte numerosos efectos del cuidado materno sobre las crías adultas (Weaver et al., 2005). Los resultados de esta tesis sirven así de base a futuros experimentos tendientes a evaluar la existencia de mecanismos epigenéticos en el modelo de VPA y a poner a prueba la hipótesis de que tratamientos como el realizado por Weaver y colaboradores son capaces de revertir la baja interacción social y/o la respuesta exacerbada del eje HPA en los animales expuestos prenatalmente a VPA.

Con respecto a la prueba de concepto, hemos observado que la inyección de un estímulo inflamatorio en el cerebelo causa una reducción en los niveles de interacción social a las 24 hs de la operación. Si bien no podemos descartar otros mecanismos, tanto el LPS como la exposición prenatal a VPA resultan en microgliosis en el cerebelo. Proponemos entonces que son éstas las células que podrían estar mediando el efecto observado, ejerciendo su acción mediante un cambio en el perfil de expresión de citoquinas, lo que modularía la actividad neuronal en el cerebelo, modificando así el comportamiento.

En 1989, Dantzer y su grupo publicaron una muy buena revisión intentando poner en orden y buscarle un sentido a la gran cantidad de datos que mostraban que las citoquinas estaban involucradas en el efecto que la enfermedad tenía sobre el sistema nervioso (Dantzer and Kelley, 1989). El concepto desarrollado era que el sistema inmune no trabajaba de manera



independiente del cerebro para regular la respuesta a antígenos, y que existía una comunicación bidireccional entre ambos sistemas. Esta idea fue muy controversial ya que, en ese momento, la principal función conocida del sistema inmune era la de producción de anticuerpos y de células cuya función era combatir y defender al organismo de distintos desafíos patogénicos.

En la actualidad, distintos trabajos nos muestran que la inflamación puede causar una reducción en los niveles de exploración en los roedores (Bluthe et al., 1994b) y que son las citoquinas las que están mediando ese efecto (Bluthe et al., 1994a). Por ejemplo, la administración de IL-1 $\beta$  tanto de manera periférica como central, causa una disminución en los niveles de exploración y esta disminución depende, al menos en parte, de la expresión de IL-6 (Bluthe et al., 2000; Konsman et al., 2008). Otro ejemplo es el efecto dual que tiene la administración central de IL-4 sobre la interacción social: reduce aun más los niveles de exploración cuando es administrada junto a una inyección de LPS periférica, pero atenúa el efecto del LPS si es administrada 12 horas antes (Bluthe et al., 2002).

En estos trabajos, cuyo diseño experimental tiene como objetivo estudiar el comportamiento relacionado con la enfermedad, se usaron distintos estímulos inmunológicos a fin de alterar la expresión de citoquinas y poder estudiar el efecto de estas alteraciones sobre el comportamiento de manera aguda. Pero esto no solo ocurre de manera aguda: se ha visto que las citoquinas también pueden tener efectos a largo plazo sobre el comportamiento, como por ejemplo en todos los modelos mencionados de AIM (ver sección 1.8.2.1 Modelo de activación inmune materna). Si bien esta tesis no ha dilucidado cómo es que la exposición prenatal a VPA resulta en una activación crónica de la microglia en el cerebelo, en base a los antecedentes de otros grupos podemos proponer mecanismos epigenéticos y/o alteraciones en la flora microbiana (Kataoka et al., 2011; de Theije et al., 2014).

Ahora bien, aún asumiendo que la microglia al activarse en el cerebelo cambia el patrón de citoquinas y ese cambio es el responsable de la

disminución en la interacción social, ¿por qué la microgliosis en el lobulillo VI/VII tiene efecto sobre ese comportamiento y no así la microgliosis en el lobulillo IV/V? ¿Qué diferencia a estos lobulillos?

Clásicamente, se ha descrito al cerebelo como un modulador, coordinador e integrador de los movimientos de las distintas partes del cuerpo. La homogeneidad que muestra en su estructura sugiere que el rol de cada zona es similar. Sin embargo, el origen embriológico y filogenético es distinto (Fulton y Dow, 1937; Altman, 1969; Gilman et al., 1981; Altman y Bayer, 1985). Los lobulillos vermales VI y VII derivan de distinto tejido primordial que los lobulillos I al IV (Altman y Bayer, 1985) y el momento en el que ocurre la neurogénesis y la organización celular en estas regiones también difiere (Altman, 1969; Altman y Bayer, 1985). Cada zona del cerebelo se conecta con regiones específicas del cerebro, siendo la naturaleza de esas conexiones la que le confiere especificidad en las funciones. El hecho de que el cerebelo se encuentre conectado con distintas zonas del cerebro, lo habilita en su rol de coordinador e integrador.

Entre 1960 y 1990, algunos investigadores analizaron cuadro por cuadro filmaciones de interacciones sociales, con el propósito de entender los eventos que tienen lugar en las mismas (Stern, 1977; Schaffer, 1984; Trevarthen, 1984; Condon, 1985; Kendon, 1990). Encontraron marcadas sincronías y simetrías entre los movimientos del cuerpo y los sonidos del habla, incluso presentes en la interacción temprana entre madres e infantes, y compararon esto con los movimientos de un vals. Sugirieron que el cerebelo estaría involucrado en la coordinación de esta danza, siendo esto una extensión natural de su rol de coordinador e integrador de movimientos, sumando en este caso información sobre los movimientos de los otros además de los propios. Resulta relevante el hecho de que tanto los lobulillos VI/VII del vermis y los correspondientes lobulillos paravermes son las áreas del cerebelo que conectan con áreas visuales y auditivas (Dow, 1991), los sentidos que el cerebelo usaría para jugar este rol adicional. Todo esto podría explicar el hecho de que la desregulación del estado inflamatorio del lobulillo VI/VII afecte el comportamiento social y esto no suceda ante la desregulación en los lobulillos IV/V.

Consideramos así que esta tesis abre futuras líneas de investigación, tendientes a evaluar los mecanismos subyacentes de los efectos a largo plazo de la exposición prenatal a VPA y al rol de la inflamación en el cerebelo sobre la modulación de la sociabilidad en roedores.

# Capítulo VI-Discusión y Conclusiones

---

## VI.1 Discusión general

Como mencionamos en la introducción, las características principales del autismo son a) un déficit marcado en la interacción social y en el uso del lenguaje y b) la presencia de comportamientos repetitivos o estereotipados. Estas características pueden manifestarse en un amplio espectro de intensidad, yendo desde un comportamiento ligeramente raro o llamativo, pero que le causa al individuo dificultades en su entorno social y/o laboral, hasta un completo aislamiento del mundo que lo rodea. También hemos mencionado la aparición del desorden en los primeros años de vida y la influencia que los desórdenes de ansiedad pueden tener sobre el comportamiento social.

Este desorden psiquiátrico es específicamente humano, diagnosticado mediante entrevistas y observación por parte de especialistas. Sin embargo, la comprensión de las interacciones entre varios genes, el efecto de factores ambientales o la interacción entre genes con el ambiente es difícil de lograr en estudios con humanos, donde las variables no pueden controlarse de manera eficiente. Por esta razón, si queremos acercarnos a entender la neurobiología del autismo, necesitamos usar modelos animales. Dadas las características del autismo, lo más lógico sería usar la especie más parecida al humano. De hecho, hay experimentos muy interesantes que se han hecho con primates superiores (Bachevalier, 1994; Bauman et al., 2014). Sin embargo, la manipulación de estos animales está asociada a numerosas dificultades, como el tiempo que demora en desarrollarse el SNC, la dificultad de generar animales transgénicos, el gasto que implica un bioterio en el que los animales vivan bien y cuestiones éticas implicadas en la experimentación con estos animales.

Esto nos lleva, como comunidad científica, a desarrollar modelos del desorden en roedores. En esta tesis, hemos usado el modelo de exposición a VPA. Si bien la exposición al VPA es solo uno de los tantos factores de riesgo, este riesgo es alto y convierte al modelo en una excelente prueba de concepto para estudiar el efecto de factores ambientales. Además, las

similitudes observadas en la neuropatología y en el comportamiento entre los humanos y el modelo en roedores, subrayan la utilidad de modelos basados en factores ambientales para estudiar la contribución y la relevancia de todos los procesos del neurodesarrollo que se ven alterados.

En particular, nosotros postulamos que la disfunción inmune constituye un posible punto de convergencia, que sería el denominador común de las alteraciones observadas en el comportamiento. La neuroinflamación crónica y las consecuencias que ésta tiene sobre el funcionamiento del cerebro serían lo que subyace a las características principales del desorden, mientras que la gran heterogeneidad que caracteriza al desorden podría deberse, al menos en parte, a los distintos factores etiológicos.

Si esto fuese así, un resultado esperado sería que cada modelo que muestre comportamientos relacionados con el autismo también muestre síntomas de activación glial o alteraciones del sistema inmune, o, de manera inversa, modelos en los que los componentes centrales de la respuesta inmune en el SNC se encuentren alterados muestren comportamientos relacionados al autismo. Retomamos algunos de los modelos mencionados en la introducción a fin de resaltar las alteraciones inmunes halladas en ellos, comparándolas con los resultados obtenidos en esta tesis.

### *VI.1.1 Modelos de activación inmune materna*

En estos modelos, poco tiempo después de la AIM, el cerebro fetal muestra niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias (Arrode-Bruses y Bruses, 2012), sugiriendo que la respuesta de AIM parte de la circulación materna, pasando por la placenta y llegando al feto. La inducción inicial de las citoquinas del cerebro fetal disminuye dentro de las 24 hs posteriores a la AIM. Sin embargo, si tomamos colectivamente los resultados de las distintas versiones de este modelo, podemos observar que esta inducción inmune, a pesar de ser transitoria, resulta suficiente como para disparar eventos moleculares que conducirían a cambios neuroinmunológicos y

comportamentales duraderos. Un ejemplo de esto podemos encontrarlo en el modelo de AIM usado por el grupo del Dr Paul Patterson (Caltech), generado por la exposición prenatal a Polil:C (ARN de cadena doble que dispara una respuesta inflamatoria similar a la respuesta inicial observada frente a diferentes infecciones virales), mediante la inyección subcutánea de este inflamógeno a hembras preñadas el DP12.5. Como se mencionó en la introducción, las crías expuestas prenatalmente al Polil:C, muestran comportamientos relacionados con el autismo (Shi et al., 2003; Smith et al., 2007; Shi et al., 2009) .

En uno de los trabajos del grupo se preguntaron si ese modelo mostraba algunas de las alteraciones inmunes observadas en pacientes con DEA. Para evaluar esto estudiaron el perfil de los distintos subtipos de células inmunes de la periferia, la funcionalidad de las líneas de leucocitos y la potencialidad de las células madre hematopoyéticas (CMH) fetales y adultas (Hsiao et al., 2012). Observaron una disminución en la cantidad de linfocitos T-regulatorios, una mayor secreción de IL-6 e IL-17 por parte de los linfocitos CD4+ obtenidos del bazo y estimulados *in vitro*, y un aumento en la cantidad de granulocitos. Este resultado está en consonancia con lo observado por nosotros: la expresión de IL-6 en el bazo es mayor en los animales expuestos a VPA luego de un estímulo inflamatorio que en los animales control.

A pesar de que existen distintos trabajos en los que evidencian que el VPA actúa como un agente anti-inflamatorio (Peng et al., 2005; Sinn et al., 2007), la similitud entre estos resultados y los hallados por nosotros y otros grupos que usan el modelo de VPA, nos motivó a evaluar si el VPA generaba una respuesta inflamatoria en los animales adultos. A este fin, medimos los niveles de corticosterona en plasma luego de inyectar a hembras adultas con la misma dosis de VPA usada para las hembras preñadas. No observamos diferencias en los niveles de corticosterona con respecto a los animales inyectados con solución salina, demostrando de esta manera que el VPA no está actuando al momento de la inyección (GD12.5) mediante la activación de la respuesta inflamatoria como en la AIM.

### *VI.1.2 Sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en el hipocampo*

El TGF- $\beta$ 1 es una citoquina conocida por su función de modular la respuesta inflamatoria (Kulkarni et al., 1993). Sin embargo, su rol en el sistema nervioso central es más amplio, participando, por ejemplo, en la proliferación y en la diferenciación celular (Bottner et al., 2000). Se ha detectado un aumento de esta citoquina en cerebros *post-mortem* de personas con DEA (Vargas et al., 2005), pero no se ha estudiado su relación con las alteraciones observadas en el comportamiento. A fin de evaluar esto, en paralelo al desarrollo de esta tesis doctoral, en el laboratorio evaluamos el efecto de la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en el cerebro adulto (Depino et al., 2011). Para esto, sobreexpresamos la citoquina en el hipocampo y, en contraposición a lo esperado, encontramos que la sobreexpresión resultaba en un aumento de la interacción social y en la disminución del comportamiento repetitivo (evaluando acicalamiento). No observamos activación de la glia ni cambios en los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 endógena o IL-6, ni a los 7, 14, 21 o 28 días post inyección. Estos resultados resultan interesantes en comparación con nuestros resultados luego de inyectar LPS en cerebelo. Si bien las inyecciones fueron en dos zonas distintas del cerebro, podemos ver cierta coherencia en los resultados obtenidos en cuanto a la condición inmune a la que es expuesta el SNC y su correlato comportamental: una condición anti-inflamatoria resulta en un aumento de la interacción social mientras que una condición pro-inflamatoria resulta en una disminución.

Ahora bien, lo que ocurre durante el desarrollo podría ser distinto a lo que ocurre en la adultez, actuando sobre mecanismos de programación a largo plazo. Por ejemplo, el aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1 observado en la adultez en humanos podría ser resultado de algún proceso ocurrido más temprano. Para evaluar esta hipótesis decidimos sobreexpresar TGF- $\beta$ 1 en el hipocampo postnatalmente (comenzando el DP14) y evaluar a los animales en la adultez (Depino et al., 2011). En este caso, la sobreexpresión ocasionó una disminución en la sociabilidad y un aumento en el comportamiento repetitivo. Además, estos animales mostraron un



aumento en los niveles de comportamientos relacionados con la depresión. No observamos en este caso activación glial, pero sorprendentemente, vimos una disminución en los niveles de TGF- $\beta$ 1 y de IL-6. Estos resultados ponen en evidencia que un estímulo inflamatorio temprano puede alterar la programación del comportamiento social, causando el mismo efecto que vimos que tiene la exposición prenatal al VPA. También puede alterar la programación del sistema inmune a nivel central, aunque en este caso, los efectos observados en los dos modelos son opuestos: una disminución de IL-6 en el modelo de sobre-expresión de TGF- $\beta$ 1 a PD14 y una ausencia de diferencias en la expresión basal de esta citoquina en el cerebro de animales expuestos prenatalmente a VPA, con evidencia de una expresión exacerbada en el cerebelo y la corteza luego de la estimulación periférica con LPS.

Cabe también destacar que en el modelo VPA no observamos cambios en los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 en el cerebero adulto. Creemos que sería interesante evaluar la expresión de esta citoquina en el cerebro joven (en la tercera semana de vida), particularmente en el hipocampo pero también en el cerebelo, para evaluar si la exposición prenatal a VPA altera la expresión temprana de esta citoquina.

### *VI.1.3 Cepa de ratones BTBR<sup>tf/J</sup>.*

Sumado a las alteraciones comportamentales mencionadas en la introducción, los ratones BTBR muestran una respuesta de estrés exagerada, que está asociada a niveles de corticosterona más altos comparados con los ratones C57 (Benno et al., 2009). Además, un trabajo tendiente a investigar el estado inflamatorio de estos animales demostró que los ratones BTBR expresan niveles más altos de citoquinas en el cerebro, y las células de la microglia expresan mayores niveles de MHC clase II (Heo et al., 2011). Además, en la periferia se observó un aumento en los niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup>. Este modelo, por lo tanto, muestra un fenotipo comportamental de la mano de alteraciones inmunológicas a nivel periférico y central como esperamos en relación a nuestra hipótesis de que las alteraciones inmunes subyacen al fenotipo comportamental, pero a

diferencia de nuestros resultados, todas estas alteraciones se evidencian incluso basalmente.

#### *VI.1.4 Ratones nulos para el gen CX3Cr1*

Otros trabajos que consideramos importante mencionar, son los trabajos realizados con los ratones nulos para el gen CX3Cr1, gen que codifica para la proteína fractalkina, a pesar de no ser un clásico modelo de autismo.

La fractalkina es una quimioquina, expresada en el SNC por las neuronas cuyo receptor se expresa exclusivamente por la microglia (Harrison et al., 1998; Jung et al., 2000). Se ha visto que la expresión de la proteína aumenta considerablemente durante el desarrollo en las neuronas (Mody et al., 2001) y que la expresión del receptor resulta esencial para la migración de la microglia (Cardona et al., 2006; Ruitenberg et al., 2008). Trabajos del grupo del Dr Cornelius Gross (EMBL-Monterotondo) demuestran que la microglia está involucrada en el proceso de podado de sinapsis y que esta función es particularmente importante durante el desarrollo, momento en el que el podado es máximo (Cruz-Martin et al., 2010). Ellos observaron que al DP8 la cantidad de sinapsis es baja tanto para los ratones salvajes como para los nulos para el gen CX3Cr1 (el gen que codifica para fractalkina), y al DP28 alcanza un máximo, que se mantiene posteriormente. Sin embargo, al DP15 la cantidad de sinapsis en un ratón salvaje es intermedia entre los valores observados entre el DP8 y el DP28, y es significativamente menor a la cantidad observada para los ratones nulos para CX3Cr1. Acompañando este resultado, los autores observaron una disminución en la densidad de microglia en CA1 del hipocampo a DP8, DP15 y DP28 de ratones nulos para CX3Cr1, alcanzando valores normales el DP40. En una serie de experimentos, mostraron que la microglia está efectivamente fagocitando a las sinapsis, y que la falta de comunicación entre neuronas y microglia (por ausencia de fractalkina) trae como consecuencia una disminución temporaria de la densidad de microglia, y así, un mayor número de sinapsis presentes durante el desarrollo

(Paolicelli et al., 2011). Los ratones nulos para CX3Cr1 muestran en la adultez una transmisión sináptica más débil, una disminución en la conectividad funcional del cerebro, déficit en la interacción social y un aumento en el comportamiento repetitivo (Zhan et al., 2014). Además, un trabajo independiente realizado en los mismos animales muestra que son más sensibles a los cambios comportamentales relacionados a la enfermedad inducidos por LPS (*sickness behavior*), y que la expresión de IL-1 $\beta$  luego de la inyección es mayor tanto en intensidad como en duración (Corona et al., 2010).

En nuestro modelo también vimos una respuesta exacerbada en cuanto a la expresión de IL-1 y una disminución en la interacción social. La pregunta que surge de manera inmediata es ¿qué está ocurriendo en nuestro modelo durante el desarrollo? La licenciada Nadia Kazlauskas, integrante del laboratorio, será quien conteste esta pregunta, por medio del análisis del estado de la neuroinflamación en el modelo VPA a distintas edades postnatales.

#### *VI.1.5 Modelo de ácido valproico*

Se han reportado previamente alteraciones inmunológicas periféricas en los animales adultos expuestos prenatalmente al VPA (Schneider et al., 2008). Los resultados de esta tesis aportan información en el mismo sentido y agregan evidencia que muestra, por primera vez, que las alteraciones del sistema inmune también se observan en el SNC.

En el capítulo IV hemos visto que animales adultos expuestos a VPA muestran un aumento en la densidad de microglia en el cerebelo y en CA1, sumado a un aumento en el tamaño de estas células en todas las zonas estudiadas. Además hemos encontrado que los animales VPA no muestran activación de la astrogliá, medida como superficie GFAP-positiva.

En contraposición a esto, existen trabajos *in vitro* que indican que el VPA promueve la proliferación de los astrocitos, e inhibe la activación de la microglia y de los macrófagos (Peng et al., 2005). Creemos que esta

contradicción es solo aparente, ya que en realidad estamos comparando una situación en la que vemos el efecto agudo del VPA en una situación *in vitro* y en el otro caso estamos viendo el efecto a largo plazo en una situación *in vivo*. Como mencionamos en la discusión del capítulo IV, esto podría explicarse por un mecanismo compensatorio que podría dispararse y establecerse durante el desarrollo.

#### *VI.1.6 Modelo de ácido propiónico*

Se ha visto que una inyección intracerebroventricular de ácido propiónico (PPA) en ratas adultas causa movimientos repetitivos y anormales, altera el comportamiento social y genera convulsiones. El análisis histológico reveló también una activación de la astrogliosis, medida como un aumento en la inmunoreactividad de GFAP, y activación de la microglia, medida como inmunoreactividad para CD68. Ambos resultados sugieren un proceso de neuroinflamación (MacFabe et al., 2007; Shultz et al., 2008; Shultz et al., 2009). Esto también se observa cuando el PPA se inyecta en ratas jóvenes: se encuentra neuroinflamación en el hipocampo y se observa que los animales muestran un déficit en el comportamiento social y dificultad para revertir una asociación aprendida previamente (MacFabe et al., 2011). Si consideramos estos resultados junto a los resultados del capítulo V podemos sugerir fuertemente que la neuroinflamación en el SNC, cualquiera sea la causa por la que se desarrolla, estaría contribuyendo a los síntomas del orden, al menos en cuanto al déficit en el comportamiento social y, probablemente, alterando otros procesos neuronales aún en la adultez.

#### VI.2 Conclusiones finales

La manipulación de citoquinas ha brindado numerosos ejemplos de que las alteraciones en el sistema inmune afectan el comportamiento. Se ha visto que un aumento en los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6

(por ejemplo, inducida por la AIM) altera el comportamiento y ocasiona cambios en la expresión génica del cerebro en las crías (Smith et al., 2007). La inyección de IL-6 por sí sola es suficiente para producir comportamientos anormales en animales expuestos a la AIM e, inversamente, si se bloquea la expresión de IL-6 durante una AIM, los animales no muestran diferencias en el comportamiento con respecto a animales control. Hemos mencionado que la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 tiene un efecto contrario sobre el comportamiento social dependiendo del momento en el que es sobreexpresada. Otro ejemplo lo constituye la neuroinflamación causada por la inyección de LPS en el cerebelo, que parece tener el mismo efecto sobre el comportamiento social que la neuroinflamación generada por la exposición prenatal al VPA.

Sin embargo, nuestro estímulo no es inflamatorio y, a pesar de eso, hemos visto las similitudes que muestra con uno que sí lo es. ¿Cómo es que la exposición al VPA puede tener efectos a largo plazo sobre el comportamiento, la función del eje HPA y la respuesta inflamatoria tanto a nivel periférico como central? Trabajos previos muestran que el efecto de la exposición prenatal al VPA sobre el comportamiento están relacionados con la función que tiene esta droga de inhibir un amplio espectro de histona deacetilasas (HDACs) (Kataoka et al., 2011). Las HDACs juegan un rol muy importante en la regulación de la expresión génica y en la diferenciación fenotípica (Hsieh y Gage, 2005; Balasubramanian et al., 2006). La HDAC1 se expresa en células madre neurales, progenitores y glia, mientras que la expresión de la HDAC2 está aumentada en neuroblastos post-mitóticos pero no en células de la glia completamente diferenciadas (MacDonald y Roskams, 2008). La modulación de las HDAC en diferentes tipos celulares y en distintos momentos de maduración podría así conducir a diferentes escenarios neuronales. Esto ayudaría a entender por qué una simple dosis de VPA el DG12.5, y no a otras edades gestacionales (Kim et al., 2011), resulta en una reducción en la sociabilidad de roedores, sugiriendo que el VPA actúa durante una ventana temporal crítica, alterando el desarrollo normal de circuitos cerebrales que regulan este comportamiento. Esto también explicaría el hecho de que el VPA en la adultez puede incluso

mejorar los síntomas relacionados con el DEA en ratones expuestos a VPA prenatalmente (Foley et al., 2012).

La metilación de histonas es otro mecanismo epigenético importante, que puede regular la transcripción génica, los programas génicos de desarrollo y el fenotipo celular (Hsieh y Gage, 2005; Mosammaparast y Shi, 2010; Tung y Winn, 2010). Del mismo modo que la acetilación de histonas, se ha propuesto también como un mecanismo dinámico, reversible e importante en cuanto a los efectos del VPA (Tung y Winn, 2010).

En línea con esto, hipotetizamos que esta alteración en los niveles de acetilación o metilación de histonas específicamente en algunos tipos celulares en el cerebro podría alterar la expresión génica y, por lo tanto, alterar el desarrollo del cerebro. Las alteraciones comportamentales y los distintos niveles de neuroinflamación observados podrían resultar de estos efectos epigenéticos del VPA. Experimentos de otros integrantes del laboratorio sobre las posibles alteraciones epigenéticas contribuirán a evaluar esta hipótesis.

Tomando en cuenta todos los modelos analizados y los resultados de esta tesis, nosotros creemos que distintos factores están confluyendo en una alteración de la funcionalidad de la microglia. Esta alteración puede ser causada por un aumento de citoquinas pro-inflamatorias (AIM), anti-inflamatorias (inyección de TGF- $\beta$ 1), por factores genéticos (cepa BTBR y modelos genéticos en general), epigenéticos (VPA), metabólicos (PPA) y probablemente por otros factores que aun no hemos identificado. Como consecuencia, se modifica la homeostasis celular y los mecanismos que se ven afectados dependen del momento o la duración que tenga el factor que está causando la alteración. En todos los casos, ocasiona cambios en la expresión génica, que, en última instancia, son los responsables de algunos de los síntomas comportamentales observados.

Intentando encontrar una explicación conceptual que contemple la variedad y cantidad de alteraciones observadas a múltiples niveles, el grupo

del Dr. Dan Geshwind (UCLA) realizó un trabajo sobre el análisis del transcriptoma que revela que el desorden ocurriría por alteraciones moleculares convergentes (Voineagu et al., 2011). Identificaron genes que se expresan diferencialmente e investigaron la relación funcional entre ellos. Encontraron así dos módulos de expresión de genes asociados al autismo que podrían actuar en conjunto, interrumpiendo el normal desarrollo del cerebro. El primer módulo de expresión diferencial de genes fue llamado "módulo neuronal". Estos genes mostraron menor expresión en personas con DEA y son genes involucrados en la función sináptica, el transporte vesicular y las proyecciones neurales. El segundo módulo fue un módulo llamado "módulo glial", su expresión se encontró aumentada en las personas con DEA, y son genes marcadores de glia e involucrados en la función inmune. A fin de evaluar si las diferencias en la expresión génica reportadas en este trabajo eran genéticas o inducidas ambientalmente, realizaron un estudio de asociación del genoma completo (en inglés, *Genome-wide association study*) de una base de datos ya publicada (Wang et al., 2009). Vieron que los genes del módulo neuronal estaban fuertemente relacionados con factores genéticos reportados para el autismo y los clasificaron como "cambios primarios". En contraposición, los genes del módulo glial, que mostraban un cambio en su expresión como resultado de procesos no genéticos, sino adaptativos o ambientales, fueron clasificados como "cambios secundarios".

La pregunta que nos propusimos responder en esta tesis fue cuál es el rol de las alteraciones inmunes en la aparición de comportamientos relacionados con el autismo. Creemos haberla respondido de manera inicial, abriendo el camino para generar nuevas preguntas. Ya mencionamos la validez que tiene el modelo de exposición a VPA, creemos que seguir trabajando con él podría ayudar a dilucidar en qué momento del desarrollo los factores inflamatorios están actuando, cuáles son los procesos que están siendo alterados y de qué manera afectan la expresión de los comportamientos relacionados con el autismo.

La posibilidad de poder identificar un denominador común en un desorden altamente variable y de causas tan heterogéneas, representaría un gran avance, ya que este común denominador podría convertirse en un posible blanco de terapias o tratamientos que puedan mejorar, al menos, algunos de los síntomas observados.



# Capítulo VII-Referencias Bibliográficas

---

- Abrahams BS, Geschwind DH. 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9:341-355.
- Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. 1994. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 42:1033-1041.
- Ahmadi A, Sayyah M, Khoshkholgh-Sima B, Choopani S, Kazemi J, Sadegh M, Moradpour F, Nahrevanian H. 2013. Intra-hippocampal injection of lipopolysaccharide inhibits kindled seizures and retards kindling rate in adult rats. *Exp Brain Res* 226:107-120.
- Akhlaghi Z, Sayyah M, Mokhtari M, Ahmadi A. 2012. Effect of intra-amygdala injection of lipopolysaccharide on kindling epileptogenesis in adult rats. *Arch Iran Med* 15:557-559.
- Akhtar MW, Raingo J, Nelson ED, Montgomery RL, Olson EN, Kavalali ET, Monteggia LM. 2009. Histone deacetylases 1 and 2 form a developmental switch that controls excitatory synapse maturation and function. *J Neurosci* 29:8288-8297.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136:269-293.
- Altman J, Bayer SA. 1985. Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J Comp Neurol* 231:42-65.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- American Psychiatric Association. 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Text Revision, Fourth Edition ed.* Washington, DC.
- Anderson GM, Jacobs-Stannard A, Chawarska K, Volkmar FR, Klinan HJ. 2007. Placental trophoblast inclusions in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 61:487-491.
- Arrode-Bruses G, Bruses JL. 2012. Maternal immune activation by poly I:C induces expression of cytokines IL-1 $\beta$  and IL-13, chemokine MCP-1 and colony stimulating factor VEGF in fetal mouse brain. *J Neuroinflammation* 9:83.

- Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. 2006. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11:47-55.
- Ashwood P, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Croen LA, Ozonoff S, Pessah IN, Van de Water J. 2008. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *J Neuroimmunol* 204:149-153.
- Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. 2010. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*.
- Atladdottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET. 2010. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 40:1423-1430.
- Attwood T. 2000. Strategies for improving the social integration of children with Asperger syndrome. *Autism* 4:85-100.
- Bachevalier J. 1994. Medial temporal lobe structures and autism: a review of clinical and experimental findings. *Neuropsychologia* 32:627-648.
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M. 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25:63-77.
- Bailey KR CJ, editor. 2009. *Anxiety-Related Behaviors in Mice*. , 2nd edition. ed. Boca Raton (FL):: CRC Press; .
- Balasubramaniyan V, Boddeke E, Bakels R, Kust B, Kooistra S, Veneman A, Copray S. 2006. Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. *Neuroscience* 143:939-951.
- Baron-Cohen S AJ, Gillberg C. . 1992. Can autism be detected at 18 months? The needle, the haystack, and the CHAT. (*British Journal of Psychiatry* 161:839-843.
- Baron-Cohen S, Scott FJ, Allison C, Williams J, Bolton P, Matthews FE, Brayne C. 2009. Prevalence of autism-spectrum conditions: UK school-based population study. *Br J Psychiatry* 194:500-509.

- Bauman M, Kemper TL. 1985. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology* 35:866-874.
- Bauman MD, Iosif AM, Smith SE, Bregere C, Amaral DG, Patterson PH. 2014. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol Psychiatry* 75:332-341.
- Bauman ML, Kemper TL. 2003. The neuropathology of the autism spectrum disorders: what have we learned? *Novartis Found Symp* 251:112-122; discussion 122-118, 281-197.
- Belmonte MK, Bourgeron T. 2006. Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nat Neurosci* 9:1221-1225.
- Benno R, Smirnova Y, Vera S, Liggett A, Schanz N. 2009. Exaggerated responses to stress in the BTBR T+tf/J mouse: an unusual behavioral phenotype. *Behav Brain Res* 197:462-465.
- Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. 2005. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *The Journal of Neuroscience* 25:8000-8009.
- Bilbo SD, Newsum NJ, Sprunger DB, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. 2007. Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. *Brain Behav Immun* 21:332-342.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR, Lu M. 2013. Changes in Prevalence of Parent-reported Autism Spectrum Disorder in School-aged U.S. Children: 2007 to 2011–2012 National Center for Health Statistics. 2013 65.
- Bluthe RM, Laye S, Michaud B, Combe C, Dantzer R, Parnet P. 2000. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* 12:4447-4456.
- Bluthe RM, Lestage J, Rees G, Bristow A, Dantzer R. 2002. Dual effect of central injection of recombinant rat interleukin-4 on

- lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* 26:86-93.
- Bluthe RM, Pawlowski M, Suarez S, Parnet P, Pittman Q, Kelley KW, Dantzer R. 1994a. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. *Psychoneuroendocrinology* 19:197-207.
- Bluthe RM, Walter V, Parnet P, Laye S, Lestage J, Verrier D, Poole S, Stenning BE, Kelley KW, Dantzer R. 1994b. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III* 317:499-503.
- Bolivar VJ, Walters SR, Phoenix JL. 2007. Assessing autism-like behavior in mice: variations in social interactions among inbred strains. *Behav Brain Res* 176:21-26.
- Borrell J, Vela JM, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C. 2002. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 26:204-215.
- Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K. 2000. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75:2227-2240.
- Bringas ME, Carvajal-Flores FN, Lopez-Ramirez TA, Atzori M, Flores G. 2013. Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. *Neuroscience* 241:170-187.
- Burton BS. 1882. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *American Chemistry Journal* 18:385-395.
- Buxbaum JD, Silverman JM, Smith CJ, Greenberg DA, Kilifarski M, Reichert J, Cook EH, Jr., Fang Y, Song CY, Vitale R. 2002. Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol Psychiatry* 7:311-316.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5335-5340.
- Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, Elia M, Schneider C, Melmed R, Sacco R, Persico AM, Levitt P. 2006. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16834-16839.

- Cardona AE, Piroo EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9:917-924.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1193-1205.
- Casanova MF. 2004. White matter volume increase and minicolumns in autism. *Annals of Neurology* 56:453; author reply 454.
- Casanova MF. 2007. The neuropathology of autism. *Brain Pathol* 17:422-433.
- Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E. 2002. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* 58:428-432.
- Castagne V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. 2011. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8 10A*.
- Condon WS. 1985. Sound-film microanalysis: A means for correlating brain and behavior. . Boston.: Little Brown and Co.
- Constantino JN, Todd RD. 2000. Genetic structure of reciprocal social behavior. *Am J Psychiatry* 157:2043-2045.
- Corbett BA, Mendoza S, Abdullah M, Wegelin JA, Levine S. 2006. Cortisol circadian rhythms and response to stress in children with autism. *Psychoneuroendocrinology* 31:59-68.
- Corona AW, Huang Y, O'Connor JC, Dantzer R, Kelley KW, Popovich PG, Godbout JP. 2010. Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* 7:93.
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. 1989. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32:777-785.
- Courchesne E. 2004. Brain development in autism: early overgrowth followed by premature arrest of growth. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:106-111.

- Courchesne E, Pierce K. 2005. Brain overgrowth in autism during a critical time in development: implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity. *Int J Dev Neurosci* 23:153-170.
- Courchesne E, Redcay E, Kennedy DP. 2004. The autistic brain: birth through adulthood. *Curr Opin Neurol* 17:489-496.
- Crawley JN. 1981. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology and Biochemistry of Behavior* 15:695-699.
- Crawley JN. 2007. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol* 17:448-459.
- Crawley JN. 2012. Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 14:293-305.
- Croen LA, Grether JK, Selvin S. 2002. Descriptive epidemiology of autism in a California population: who is at risk? *J Autism Dev Disord* 32:217-224.
- Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M. 2002. Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology* 45:1-6.
- Cruz-Martin A, Crespo M, Portera-Cailliau C. 2010. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci* 30:7793-7803.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29:571-625.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. 2003. Natural variations in maternal care are associated with estrogen receptor alpha expression and estrogen sensitivity in the medial preoptic area. *Endocrinology* 144:4720-4724.
- Chao HT, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, Neul JL, Gong S, Lu HC, Heintz N, Ekker M, Rubenstein JL, Noebels JL, Rosenmund C, Zoghbi HY. 2010. Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 468:263-269.

- Chess S. 1977. Follow-up report on autism in congenital rubella. *J Autism Child Schizophr* 7:69-81.
- Chomiak T, Hu B. 2013. Alterations of neocortical development and maturation in autism: insight from valproic acid exposure and animal models of autism. *Neurotoxicol Teratol* 36:57-66.
- Christensen J, Gronborg TK, Sorensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. 2013. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309:1696-1703.
- Christianson AL, Chesler N, Kromberg JG. 1994. Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Dev Med Child Neurol* 36:361-369.
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. 1998. Expression of purine metabolism-related enzymes by microglial cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 398:333-346.
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B. 2003. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458:144-157.
- Dantzer R. 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain, Behavior, and Immunity* 15:7-24.
- Dantzer R, Kelley KW. 1989. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci* 44:1995-2008.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46-56.
- David DJ, Renard CE, Jolliet P, Hascoet M, Bourin M. 2003. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 166:373-382.
- Davidson PW, Cory-Slechta DA, Thurston SW, Huang LS, Shamlaye CF, Gunzler D, Watson G, van Wijngaarden E, Zareba G, Klein JD, Clarkson TW, Strain JJ, Myers GJ. 2011. Fish consumption and prenatal methylmercury exposure: cognitive and behavioral outcomes in the main cohort at 17 years from the Seychelles child development study. *Neurotoxicology* 32:711-717.



- Dawson G, Munson J, Estes A, Osterling J, McPartland J, Toth K, Carver L, Abbott R. 2002. Neurocognitive function and joint attention ability in young children with autism spectrum disorder versus developmental delay. *Child Dev* 73:345-358.
- Dawson G, Webb SJ, Carver L, Panagiotides H, McPartland J. 2004. Young children with autism show atypical brain responses to fearful versus neutral facial expressions of emotion. *Dev Sci* 7:340-359.
- de Theije CG, Koelink PJ, Korte-Bouws GA, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD. 2014. Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 37:240-247.
- de Theije CG, Wu J, da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM, Kraneveld AD. 2011. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1:S70-80.
- Deacon RM. 2009. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behavioural Brain Research* 200:128-133.
- DeCastro M, Nankova BB, Shah P, Patel P, Mally PV, Mishra R, La Gamma EF. 2005. Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 142:28-38.
- Deer B. 2011. How the case against the MMR vaccine was fixed. *BMJ* 342:c5347.
- DeLorey TM, Sahbaie P, Hashemi E, Homanics GE, Clark JD. 2008. Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. *Behav Brain Res* 187:207-220.
- Depino AM, Alonso M, Ferrari C, del Rey A, Anthony D, Besedovsky H, Medina JH, Pitossi F. 2004. Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus* 14:526-535.
- Depino AM, Lucchina L, Pitossi F. 2011. Early and adult hippocampal TGF-beta1 overexpression have opposite effects on behavior. *Brain Behav Immun* 25:1582-1591.

- Depino AM, Tsetsenis T, Gross C. 2008. GABA homeostasis contributes to the developmental programming of anxiety-related behavior. *Brain Res* 1210:189-199.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31:673-704.
- Deykin EYM, Brian. 1979. The incidence of seizures among children with autistic symptoms. *The American journal of psychiatry*.
- DiLalla DL RS. 1994. Domains of the Childhood Autism Rating Scale: Relevance for diagnosis and treatment. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 24:115-128.
- DiLavore PC LC, Rutter ML. 1995. The pre-linguistic autism diagnostic observation schedule. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 25:355-379.
- Dow RS, Kramer, R.E., and Robertson, L.T. . 1991. *Disorders of the cerebellum*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company.
- Dragunow M, Greenwood JM, Cameron RE, Narayan PJ, O'Carroll SJ, Pearson AG, Gibbons HM. 2006. Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells. *Neuroscience* 140:1149-1156.
- Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Le Guisquet AM, Garreau L, Ternant D, Bodard S, Jaumain E, Gulhan Z, Belzung C, Andres CR, Chalon S, Guilloteau D. 2010. Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism. *Neurosci Lett* 470:55-59.
- Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Tourlet S, Guilloteau D, Chalon S, Andres CR. 2011. Fetal exposure to teratogens: Evidence of genes involved in autism? *Neurosci Biobehav Rev*.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158:1021-1029.
- Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. 2010. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 24:64-71.
- Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert E, Boncinelli E, Balling R, Nadeau JH. 2000. A mouse model for

- valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Hum Mol Genet* 9:227-236.
- Falluel-Morel A, Sokolowski K, Sisti HM, Zhou X, Shors TJ, Diccio-Bloom E. 2007. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. *J Neurochem* 103:1968-1981.
- Fatemi SH, Cuadra AE, El-Fakahany EE, Sidwell RW, Thuras P. 2000. Prenatal viral infection causes alterations in nNOS expression in developing mouse brains. *Neuroreport* 11:1493-1496.
- Fatemi SH, Emamian ES, Kist D, Sidwell RW, Nakajima K, Akhter P, Shier A, Sheikh S, Bailey K. 1999. Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry* 4:145-154.
- Fatemi SH, Emamian ES, Sidwell RW, Kist DA, Stary JM, Earle JA, Thuras P. 2002. Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice. *Mol Psychiatry* 7:633-640.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Huang H, Oishi K, Mori S, Smee DF, Pearce DA, Winter C, Sohr R, Juckel G. 2008. Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr Res* 99:56-70.
- Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA, 3rd. 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16:444-453.
- Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, McTeague M, Sandler R, Wexler H, Marlowe EM, Collins MD, Lawson PA, Summanen P, Baysallar M, Tomzynski TJ, Read E, Johnson E, Rolfe R, Nasir P, Shah H, Haake DA, Manning P, Kaul A. 2002. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis* 35:S6-S16.
- Finsen BR, Jorgensen MB, Diemer NH, Zimmer J. 1993a. Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia* 7:41-49.
- Finsen BR, Sorensen T, Castellano B, Pedersen EB, Zimmer J. 1991. Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron

- microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol* 32:159-183.
- Finsen BR, Tonder N, Xavier GF, Sorensen JC, Zimmer J. 1993b. Induction of microglial immunomolecules by anterogradely degenerating mossy fibres in the rat hippocampal formation. *J Chem Neuroanat* 6:267-275.
- Foley AG, Gannon S, Rombach-Mullan N, Prendergast A, Barry C, Cassidy AW, Regan CM. 2012. Class I histone deacetylase inhibition ameliorates social cognition and cell adhesion molecule plasticity deficits in a rodent model of autism spectrum disorder. *Neuropharmacology* 63:750-760.
- Fombonne E. 2008. Is autism getting commoner? *Br J Psychiatry* 193:59.
- Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S. 2002. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol* 3:875-881.
- Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M. 2009. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res* 65:35-43.
- Fulton JF, Dow RS. 1937. The Cerebellum: A Summary of Functional Localization. *Yale J Biol Med* 10:89-119.
- Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. 2010. Validating gamma oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry* 68:1100-1106.
- Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, Persico AM. 2008. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis* 30:303-311.
- Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P, Freire M. 2007. Cajal's contributions to the study of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12:161-174.
- Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. 2009. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry* 195:7-14.
- Gaykema RP, Goehler LE, Tilders FJ, Bol JG, McGorry M, Fleshner M, Maier SF, Watkins LR. 1998. Bacterial endotoxin induces fos

- immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Neuroimmunomodulation* 5:234-240.
- Geschwind DH, Levitt P. 2007. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol* 17:103-111.
- Ghaziuddin M, Ghaziuddin N, Greden J. 2002. Depression in persons with autism: implications for research and clinical care. *J Autism Dev Disord* 32:299-306.
- Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. 2007. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14:1324-1335.
- Gilman S, Bloedel JR, Lechtenberg R. 1981. Disorders of the cerebellum. *Annals of Neurology* 13:415.
- Gillberg C. 1983. Autistic children's hand preferences: results from an epidemiological study of infantile autism. *Psychiatry Res* 10:21-30.
- Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. 2005. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 48:903-917.
- Graciarena M, Depino AM, Pitossi FJ. 2010. Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGFbeta1 downregulation. *Brain Behav Immun* 24:1301-1309.
- Graciarena M, Roca V, Mathieu P, Depino AM, Pitossi FJ. 2013. Differential vulnerability of adult neurogenesis by adult and prenatal inflammation: role of TGF-beta1. *Brain Behav Immun* 34:17-28.
- Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, White RF, Jorgensen PJ, Weihe P, Debes F, Keiding N. 1999. Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am J Epidemiol* 150:301-305.
- Green J, Gilchrist A, Burton D, Cox A. 2000. Social and psychiatric functioning in adolescents with Asperger syndrome compared with conduct disorder. *J Autism Dev Disord* 30:279-293.
- Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 148:164-170.
- Grigorenko EL, Han SS, Yrigollen CM, Leng L, Mizue Y, Anderson GM, Mulder EJ, de Bildt A, Minderaa RB, Volkmar FR, Chang JT, Bucala R. 2008.

- Macrophage migration inhibitory factor and autism spectrum disorders. *Pediatrics* 122:e438-445.
- Gupta S, Aggarwal S, Rathanavaran B, Lee T. 1998. Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *Journal of Neuroimmunology* 85:106-109.
- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S, Nitsch R. 1997. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus* 7:341-349.
- Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen L, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether J, Risch N. 2011. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of General Psychiatry* 11:1095-1102.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, Du F, Yuan P, Gould TD, Manji HK, Chen G. 2004. Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J Neurosci* 24:6590-6599.
- Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriya S. 1999. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J Nutr* 129:942-948.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10896-10901.
- Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M, Stoeckel ME. 1998. Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res* 794:211-224.
- Hazlett HC, Poe MD, Gerig G, Smith RG, Piven J. 2006. Cortical gray and white brain tissue volume in adolescents and adults with autism. *Biol Psychiatry* 59:1-6.
- Heo Y, Zhang Y, Gao D, Miller VM, Lawrence DA. 2011. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. *PLoS One* 6:e20912.

- Herbert MR, Ziegler DA, Deutsch CK, O'Brien LM, Lange N, Bakardjiev A, Hodgson J, Adrien KT, Steele S, Makris N, Kennedy D, Harris GJ, Caviness VS, Jr. 2003. Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys. *Brain* 126:1182-1192.
- Herbert MR, Ziegler DA, Makris N, Filipek PA, Kemper TL, Normandin JJ, Sanders HA, Kennedy DN, Caviness VS, Jr. 2004. Localization of white matter volume increase in autism and developmental language disorder. *Ann Neurol* 55:530-540.
- Hofvander B, Delorme R, Chaste P, Nyden A, Wentz E, Stahlberg O, Herbrecht E, Stopin A, Anckarsater H, Gillberg C, Rastam M, Leboyer M. 2009. Psychiatric and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. *BMC Psychiatry* 9:35.
- Hogg S. 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54:21-30.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ. 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in Neurosciences* 18:83-88.
- Hornig M, Briese T, Buie T, Bauman ML, Lauwers G, Siemetzki U, Hummel K, Rota PA, Bellini WJ, O'Leary JJ, Sheils O, Alden E, Pickering L, Lipkin WI. 2008. Lack of association between measles virus vaccine and autism with enteropathy: a case-control study. *PLoS ONE* 3:e3140.
- Hornig M, Lipkin WI. 2001. Infectious and immune factors in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders: epidemiology, hypotheses, and animal models. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:200-210.
- Howard CV, Reed MG. 2005. *Unbiased Stereology*. New York: Garland Science/BIOS Scientific.
- Hsiao EY, McBride SW, Chow J, Mazmanian SK, Patterson PH. 2012. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12776-12781.
- Hsieh J, Gage FH. 2005. Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 17:664-671.
- Huang Y, Henry CJ, Dantzer R, Johnson RW, Godbout JP. 2008. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in

- aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiology of Aging* 29:1744-1753.
- Hughes JR. 2007. Autism: the first firm finding = underconnectivity? *Epilepsy Behav* 11:20-24.
- Hutsler JJ, Zhang H. 2010. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* 1309:83-94.
- Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. 2003. Association between thimerosal-containing vaccine and autism. *JAMA* 290:1763-1766.
- Inouye M, Murakami U. 1980. Temporal and spatial patterns of Purkinje cell formation in the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 194:499-503.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57:1-9.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34:27-29.
- Jessberger S, Nakashima K, Clemenson GD, Jr., Mejia E, Mathews E, Ure K, Ogawa S, Sinton CM, Gage FH, Hsieh J. 2007. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J Neurosci* 27:5967-5975.
- Johnston GR, Webster NR. 2009. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth* 102:453-462.
- Jonakait GM. 2007. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 25:415-425.
- Jorde LB, Hasstedt SJ, Ritvo ER, Mason-Brothers A, Freeman BJ, Pingree C, McMahon WM, Petersen B, Jenson WR, Mo A. 1991. Complex segregation analysis of autism. *Am J Hum Genet* 49:932-938.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.



- Jyonouchi H. 2009. Food allergy and autism spectrum disorders: is there a link? *Curr Allergy Asthma Rep* 9:194-201.
- Jyonouchi H, Sun S, Itokazu N. 2002. Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. *Neuropsychobiology* 46:76-84.
- Jyonouchi H, Sun S, Le H. 2001. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *Journal of Neuroimmunology* 120:170-179.
- Kanner L. 1943. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child* 2:217-250.
- Kanner L. 1954. To what extent is early infantile autism determined by constitutional inadequacies? *Research Publication of the Association for Research in Nervous and Mental Diseases* 33:378-385.
- Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. 2013. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci* 7:3.
- Karuri AR, Dobrowsky E, Tannock IF. 1993. Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. *Br J Cancer* 68:1080-1087.
- Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. 2011. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:91-103.
- Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. 2012. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol*:1-13.
- Kates WR, Burnette CP, Eliez S, Strunge LA, Kaplan D, Landa R, Reiss AL, Pearlson GD. 2004. Neuroanatomic variation in monozygotic twin pairs discordant for the narrow phenotype for autism. *Am J Psychiatry* 161:539-546.
- Kendon A. 1990. *Conducting Interaction: Patterns of Behavior in Focused Encounters*. . Cambridge, UK.: Cambridge University Press.

- Kent S, Bluthé RM, Dantzer R, Hardwick AJ, Kelley KW, Rothwell NJ, Vannice JL. 1992. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9117-9120.
- Kerschensteiner M, Meinel E, Hohlfeld R. 2009. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158:1122-1132.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Yang SI, Cheong JH, Shin CY, Ko KH. 2011. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 201:137-142.
- Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, Boyle CA, Perrin JM, Ghandour RM, Singh GK, Strickland BB, Trevathan E, van Dyck PC. 2009. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics* 124:1395-1403.
- Kolozsi E, Mackenzie RN, Rouillet FI, deCatanzaro D, Foster JA. 2009. Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience* 163:1201-1210.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Wong WS, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. 2012. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488:471-475.
- Konsman JP, Kelley K, Dantzer R. 1999. Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience* 89:535-548.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. 2002. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences* 25:154-159.
- Konsman JP, Veeneman J, Combe C, Poole S, Luheshi GN, Dantzer R. 2008. Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *European Journal of Neuroscience* 28:2499-2510.

- Kreutzberg G. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19:312-318.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774.
- Laegreid L, Kyllerman M, Hedner T, Hagberg B, Viggedahl G. 1993. Benzodiazepine amplification of valproate teratogenic effects in children of mothers with absence epilepsy. *Neuropediatrics* 24:88-92.
- Landa RJ, Holman KC, Garrett-Mayer E. 2007. Social and communication development in toddlers with early and later diagnosis of autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 64:853-864.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Lawson MA, Parrott JM, McCusker RH, Dantzer R, Kelley KW, JC OC. 2013. Intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide induces indoleamine-2,3-dioxygenase-dependent depression-like behaviors. *J Neuroinflammation* 10:87.
- Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, Diemer NH, Finsen B. 1997. Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J Comp Neurol* 386:461-476.
- Licinio J, Alvarado I, Wong ML. 2002. Autoimmunity in autism. *Mol Psychiatry* 7:329.
- Licinio J, Wong M-L. 1997. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation* 100:2941-2947.
- Lin HC, Gean PW, Wang CC, Chan YH, Chen PS. 2013. The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model. *PLoS One* 8:e55248.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. 1997. Maternal care, hippocampal

- glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
- Lu L, Shen RN, Zhou SZ, Wu B, Kim YJ, Lin ZH, Ruscetti S, Ralph P, Broxmeyer HE. 1991. Efficacy of recombinant human macrophage colony-stimulating factor in combination with whole-body hyperthermia in the treatment of mice infected with the polycythemia-inducing strain of the Friend virus complex. *Exp Hematol* 19:804-809.
- MacDonald JL, Roskams AJ. 2008. Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. *Dev Dyn* 237:2256-2267.
- MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hoffman JE, Boon F, Taylor AR, Kavaliers M, Ossenkopp KP. 2007. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res* 176:149-169.
- MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. 2011. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res* 217:47-54.
- Malik M, Sheikh AM, Wen G, Spivack W, Brown WT, Li X. 2011. Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. *Immunobiology* 216:80-85.
- Mathieu P, Battista D, Depino A, Roca V, Graciarena M, Pitossi F. 2010. The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *J Neurochem* 112:1368-1385.
- Maurer MH, Canis M, Kuschinsky W, Duelli R. 2004. Correlation between local monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and glucose transporter 1 (GLUT1) densities in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 355:105-108.
- McCormick JA, Lyons V, Jacobson MD, Noble J, Diorio J, Nyirenda M, Weaver S, Ester W, Yau JL, Meaney MJ, Seckl JR, Chapman KE. 2000. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events. *Mol Endocrinol* 14:506-517.

- McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, Phoenix JL, Bolivar VJ, Crawley JN. 2008. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav* 7:152-163.
- McKinney WT. 1984. Animal models of depression: an overview. *Psychiatr Dev* 2:77-96.
- Mehta MV, Gandal MJ, Siegel SJ. 2011. mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. *PLoS One* 6:e26077.
- Merrill JE. 1992. Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci* 14:1-10.
- Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. 1963. [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. *Therapie* 18:435-438.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. 2005. Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 29:913-947.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. 2006. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 26:4752-4762.
- Meyer U, Yee BK, Feldon J. 2007. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 13:241-256.
- Milbrandt J. 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238:797-799.
- Minshew NJ, Williams DL. 2007. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol* 64:945-950.
- Mizuno A, Villalobos ME, Davies MM, Dahl BC, Muller RA. 2006. Partially enhanced thalamocortical functional connectivity in autism. *Brain Res* 1104:160-174.
- Mody M, Cao Y, Cui Z, Tay KY, Shyong A, Shimizu E, Pham K, Schultz P, Welsh D, Tsien JZ. 2001. Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8862-8867.

- Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. 2007. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 81:1289-1297.
- Monti B, Polazzi E, Contestabile A. 2009. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol* 2:95-109.
- Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, Dean JC. 2000. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet* 37:489-497.
- Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, Courchesne E, Everall IP. 2010. Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biol Psychiatry* 68:368-376.
- Mortensen PB, Clausen MR. 1996. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 216:132-148.
- Mosammaparast N, Shi Y. 2010. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* 79:155-179.
- Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 ( Pt 4):701-722.
- Moy SS, Nadler JJ. 2008. Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. *Mol Psychiatry* 13:4-26.
- Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Nonneman RJ, Segall SK, Andrade GM, Crawley JN, Magnuson TR. 2008. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research* 191:118-129.
- Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, Barbaro JR, Wilson LM, Threadgill DW, Lauder JM, Magnuson TR, Crawley JN. 2007. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res* 176:4-20.
- Myles B, Barnhill, G., Hagiwara, T., Griswold, D.E., & Simpson, R. . 2001. A synthesis of studies on the intellectual, academic, social/emotional and sensory characteristics of children and youth with Asperger Syndrome. *Education and Training in Mental Retardation and Developmental Disabilities* 36:304-311.

- Nagarajan RP, Patzel KA, Martin M, Yasui DH, Swanberg SE, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Van de Water J, Pessah IN, Jiang R, Robinson WP, LaSalle JM. 2008. MECP2 promoter methylation and X chromosome inactivation in autism. *Autism Res* 1:169-178.
- Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsujii M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Suda S, Sugiyama T, Takei N, Mori N. 2010. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Arch Gen Psychiatry* 67:59-68.
- Nakao S, Moriya Y, Furuyama S, Niederman R, Sugiyama H. 1998. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol Int* 22:331-337.
- Nakasato A, Nakatani Y, Seki Y, Tsujino N, Umino M, Arita H. 2008. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. *Brain Res* 1193:128-135.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A. 2005. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207:687-693.
- Noriuchi M, Kikuchi Y, Yoshiura T, Kira R, Shigeto H, Hara T, Tobimatsu S, Kamio Y. 2010. Altered white matter fractional anisotropy and social impairment in children with autism spectrum disorder. *Brain Res* 1362:141-149.
- Odell D, Maciulis A, Cutler A, Warren L, McMahon WM, Coon H, Stubbs G, Henley K, Torres A. 2005. Confirmation of the association of the C4B null allele in autism. *Hum Immunol* 66:140-145.
- Okada A, Kushima K, Aoki Y, Bialer M, Fujiwara M. 2005. Identification of early-responsive genes correlated to valproic acid-induced neural tube defects in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:229-238.
- Okada K, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suda S, Suzuki K, Sugihara G, Matsuzaki H, Sugiyama T, Kawai M, Minabe Y, Takei N, Mori N. 2007. Decreased serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:187-190.

- Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura H, Iyo M. 2006. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:546-554.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Paper retirado: Retraction--Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 375:445.
- Parab S, Nankova BB, La Gamma EF. 2007. Differential regulation of the tyrosine hydroxylase and enkephalin neuropeptide transmitter genes in rat PC12 cells by short chain fatty acids: concentration-dependent effects on transcription and RNA stability. *Brain Res* 1132:42-50.
- Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. 2005. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry* 17:485-495.
- Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. 2005. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* 54:987-991.
- Patterson PH. 2002. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Current Opinion in Neurobiology* 12:115-118.
- Patterson PH. 2008. Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res* 204:313-321.
- Paxinos G, Franklin K, editors. 2004. *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*, Second ed: Academic Press.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.
- Peng GS, Li G, Tzeng NS, Chen PS, Chuang DM, Hsu YD, Yang S, Hong JS. 2005. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res* 134:162-169.



- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
- Perry VH, Teeling J. 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol* 35:601-612.
- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. 1997. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of Neuroscience Research* 48:287-298.
- Plotkin S, Banks W, Kastin A. 1996. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1a across the blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmunology* 67:41-47.
- Plotkin S, Banks W, Maness L, Kastin A. 2000. Differential transport of rat and human interleukin-1a across the blood-brain barrier and blood-testis barrier in rats. *Brain Research* 881:57-61.
- Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3-33.
- Quan N, Sundar SK, Weiss JM. 1994. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 49:125-134.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Ransom BR, Kettenmann H. 1990. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia* 3:258-266.
- Rinaldi T, Perrodin C, Markram H. 2008a. Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism. *Front Neural Circuits* 2:4.
- Rinaldi T, Silberberg G, Markram H. 2008b. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb Cortex* 18:763-770.

- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Croog VJ. 1997. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol* 11:417-422.
- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. 1996. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *The Journal of Comparative Neurology* 370:247-261.
- Rorig B, Klaus G, Sutor B. 1996. Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol* 490 ( Pt 1):31-49.
- Roulet FI, Lai JK, Foster JA. 2013. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol* 36:47-56.
- Roulet FI, Wollaston L, Decatanzaro D, Foster JA. 2010. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience* 170:514-522.
- Ruitenber MJ, Vukovic J, Blomster L, Hall JM, Jung S, Filgueira L, McMenamin PG, Plant GW. 2008. CX3CL1/fractalkine regulates branching and migration of monocyte-derived cells in the mouse olfactory epithelium. *J Neuroimmunol* 205:80-85.
- Saetre P, Emilsson L, Axelsson E, Kreuger J, Lindholm E, Jazin E. 2007. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC Psychiatry* 7:46.
- Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN. 2008. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PLoS ONE* 3:e3067.
- Schaffer HR. 1984. *The Child's Entry into a Social World*. . London: Academic Press.
- Schendel D, Bhasin TK. 2008. Birth weight and gestational age characteristics of children with autism, including a comparison with other developmental disabilities. *Pediatrics* 121:1155-1164.
- Schmahmann JD. 2004. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16:367-378.
- Schmitz T, Chew LJ. 2008. Cytokines and myelination in the central nervous system. *ScientificWorldJournal* 8:1119-1147.

- Schneider T, Przewlocki R. 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30:80-89.
- Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, Przewlocki R. 2008. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33:728-740.
- Schneider T, Turczak J, Przewlocki R. 2006. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology* 31:36-46.
- Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Lotspeich LJ, Kwon H, Buonocore MH, Lammers CR, Reiss AL, Amaral DG. 2004. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J Neurosci* 24:6392-6401.
- Schwarz JM, Bilbo SD. 2012. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Horm Behav* 62:243-253.
- Shah P, Nankova BB, Parab S, La Gamma EF. 2006. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. *Brain Res* 1107:13-23.
- Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H. 2002. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35:243-254.
- Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. 2003. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 23:297-302.
- Shi L, Smith SE, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. 2009. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav Immun* 23:116-123.
- Shukla DK, Keehn B, Muller RA. 2011. Tract-specific analyses of diffusion tensor imaging show widespread white matter compromise in autism spectrum disorder. *J Child Psychol Psychiatry* 52:286-295.
- Shultz SR, Macfabe DF, Martin S, Jackson J, Taylor R, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. 2009. Intracerebroventricular injections of the enteric bacterial metabolic product propionic acid impair cognition and

- sensorimotor ability in the Long-Evans rat: further development of a rodent model of autism. *Behav Brain Res* 200:33-41.
- Shultz SR, MacFabe DF, Ossenkopp KP, Scratch S, Whelan J, Taylor R, Cain DP. 2008. Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology* 54:901-911.
- Silver LM. 1995. *Mouse Genetics: Concepts and Applications*: Oxford University Press.
- Singh VK. 1996. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. *J Neuroimmunol* 66:143-145.
- Singh VK, Lin SX, Newell E, Nelson C. 2002. Abnormal measles-mumps-rubella antibodies and CNS autoimmunity in children with autism. *J Biomed Sci* 9:359-364.
- Singh VK, Lin SX, Yang VC. 1998. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clin Immunol Immunopathol* 89:105-108.
- Singh VK, Singh EA, Warren RP. 1997a. Hyperserotonemia and serotonin receptor antibodies in children with autism but not mental retardation. *Biol Psychiatry* 41:753-755.
- Singh VK, Warren R, Averett R, Ghaziuddin M. 1997b. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatr Neurol* 17:88-90.
- Sinn DI, Kim SJ, Chu K, Jung KH, Lee ST, Song EC, Kim JM, Park DK, Kun Lee S, Kim M, Roh JK. 2007. Valproic acid-mediated neuroprotection in intracerebral hemorrhage via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation. *Neurobiol Dis* 26:464-472.
- Skaar DA, Shao Y, Haines JL, Stenger JE, Jaworski J, Martin ER, DeLong GR, Moore JH, McCauley JL, Sutcliffe JS, Ashley-Koch AE, Cuccaro ML, Folstein SE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. 2005. Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Mol Psychiatry* 10:563-571.
- Smith IM, Nichols SL, Issekutz K, Blake K. 2005. Behavioral profiles and symptoms of autism in CHARGE syndrome: preliminary Canadian epidemiological data. *Am J Med Genet A* 133A:248-256.

- Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 27:10695-10702.
- Smith SEPP, P.H. 2008. Alteration of neurodevelopment and behavior by maternal immune activation. Norwell, MA: Springer
- Snow WM, Hartle K, Ivanko TL. 2008. Altered morphology of motor cortex neurons in the VPA rat model of autism. *Dev Psychobiol* 50:633-639.
- Spratt EG, Nicholas JS, Brady KT, Carpenter LA, Hatcher CR, Meekins KA, Furlanetto RW, Charles JM. 2012. Enhanced cortisol response to stress in children in autism. *J Autism Dev Disord* 42:75-81.
- Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, Bohman M. 1989. A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry* 30:405-416.
- Stern D. 1977. *The First Relationship: Infant and Mother*. Cambridge, MA.: Harvard University Press.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. 1989. Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 21:117-123.
- Streit WJ, Schulte BA, Balentine DJ, Spicer SS. 1985. Histochemical localization of galactose-containing glycoconjugates in sensory neurons and their processes in the central and peripheral nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 33:1042-1052.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581.
- Stromland K, Nordin V, Miller M, Akerstrom B, Gillberg C. 1994. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol* 36:351-356.
- Stubbs EG, Crawford ML. 1977. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr* 7:49-55.
- Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kamenno Y, Shimmura C, Kawai S, Yoshihara Y, Wakuda T, Takebayashi K, Takagai S, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. 2011. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One* 6:e20470.

- Sweeten TL, Fujinami RS. 2004. A potential link between measles virus and autism: age-matched control groups are essential. *Pediatr Neurol* 30:78; author reply 78.
- Tamiji J, Crawford DA. 2010. The neurobiology of lipid metabolism in autism spectrum disorders. *Neurosignals* 18:98-112.
- Torres AR, Maciulis A, Odell D. 2001. The association of MHC genes with autism. *Front Biosci* 6:D936-943.
- Treit D. 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 9:203-222.
- Trevarthen C. 1984. How control of movement develops. . Bernstein Reassessed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M. 2012. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 488:647-651.
- Tsujino N, Nakatani Y, Seki Y, Nakasato A, Nakamura M, Sugawara M, Arita H. 2007. Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neurosci Res* 57:289-295.
- Tung EW, Winn LM. 2010. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248:201-209.
- Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57:67-81.
- Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 7:399-412.
- Verkhatsky A, Rodriguez JJ, Parpura V. 2013. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol* 8:149-158.
- Virchow R, editor. 1858. Die Cellular pathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre, 1st edition ed. Berlin.
- Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH. 2011. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 474:380-384.

- Vojdani A, Campbell AW, Anyanwu E, Kashanian A, Bock K, Vojdani E. 2002. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, *Chlamydia pneumoniae* and *Streptococcus* group A. *Journal of Neuroimmunology* 129:168-177.
- Vorhees CV. 1987. Behavioral teratogenicity of valproic acid: selective effects on behavior after prenatal exposure to rats. *Psychopharmacology (Berl)* 92:173-179.
- Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, McRae P, Halladay AK. 2006. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord* 36:779-793.
- Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. 2004. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inher Metab Dis* 27:427-448.
- Walsh RN, Cummins RA. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83:482-504.
- Wang DD, Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JL, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Hakonarson H. 2009. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459:528-533.
- Wang LW, Tancredi DJ, Thomas DW. 2011. The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. *J Dev Behav Pediatr* 32:351-360.
- Warren RP, Margaretten NC, Pace NC, Foster A. 1986. Immune abnormalities in patients with autism. *J Autism Dev Disord* 16:189-197.

- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. 2004a. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7:847-854.
- Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M. 2005. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 25:11045-11054.
- Weaver IC, Diorio J, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ. 2004b. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Ann N Y Acad Sci* 1024:182-212.
- Weaver IC, La Plante P, Weaver S, Parent A, Sharma S, Diorio J, Chapman KE, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ. 2001. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell Endocrinol* 185:205-218.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. 2009. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry* 108:1343-1359.
- Williams G, King J, Cunningham M, Stephan M, Kerr B, Hersh JH. 2001. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev Med Child Neurol* 43:202-206.
- Williams PG, Hersh JH. 1997. A male with fetal valproate syndrome and autism. *Dev Med Child Neurol* 39:632-634.
- Willner P, Muscat R, Papp M. 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16:525-534.
- Wing L, Potter D. 2002. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:151-161.
- Wirenfeldt M, Dalmau I, Finsen B. 2003. Estimation of absolute microglial cell numbers in mouse fascia dentata using unbiased and efficient stereological cell counting principles. *Glia* 44:129-139.



- Wiznitzer M. 2004. Autism and tuberous sclerosis. *J Child Neurol* 19:675-679.
- Wohr M, Rouillet FI, Crawley JN. 2011. Reduced scent marking and ultrasonic vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *Genes Brain Behav* 10:35-43.
- Wolff AR, Bilkey DK. 2008. Immune activation during mid-gestation disrupts sensorimotor gating in rat offspring. *Behav Brain Res* 190:156-159.
- Woo CC, Leon M. 2013. Environmental enrichment as an effective treatment for autism: a randomized controlled trial. *Behav Neurosci* 127:487-497.
- Wu S, Jia M, Ruan Y, Liu J, Guo Y, Shuang M, Gong X, Zhang Y, Yang X, Zhang D. 2005. Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. *Biol Psychiatry* 58:74-77.
- Yang M, Zhodzishsky V, Crawley JN. 2007. Social deficits in BTBR T+tf/J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers. *Int J Dev Neurosci* 25:515-521.
- Yang T, Ramocki MB, Neul JL, Lu W, Roberts L, Knight J, Ward CS, Zoghbi HY, Kheradmand F, Corry DB. 2012. Overexpression of methyl-CpG binding protein 2 impairs T(H)1 responses. *Sci Transl Med* 4:163ra158.
- Young DM, Schenk AK, Yang SB, Jan YN, Jan LY. 2010. Altered ultrasonic vocalizations in a tuberous sclerosis mouse model of autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11074-11079.
- Zerbo O, Iosif AM, Delwiche L, Walker C, Hertz-Picciotto I. 2011. Month of conception and risk of autism. *Epidemiology* 22:469-475.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT. 2014. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17:400-406.
- Zhang Y, Sun Y, Wang F, Wang Z, Peng Y, Li R. 2012. Downregulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. *Neurochem Res* 37:1409-1419.

Zimmerman AW, Jyonouchi H, Comi AM, Connors SL, Milstien S, Varsou A, Heyes MP. 2005. Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. *Pediatr Neurol* 33:195-201.

Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I. 2003. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 28:1778-1789.

## VIII - Publicaciones

---

# Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism

Luciana Lucchina and Amaicha Mara Depino

Increasing clinical and experimental evidence links immune and inflammatory alterations with the pathogenesis of autism spectrum disorders (ASD). Autistic individuals show signs of neuroinflammation, altered inflammatory responses, and immune abnormalities throughout life. Mice injected subcutaneously with 600 mg/kg valproic acid (VPA600) at gestational day 12.5 show reduced social interaction in adulthood (at 8 weeks of age), and they have been proposed as a mouse model of autism. Here, we show that these adult animals present signs of chronic glial activation in the hippocampus and the cerebellum. Moreover, when they are challenged with a peripheral inflammatory stimulus (intraperitoneal lipopolysaccharides, LPS), VPA600 animals show an exacerbated inflammatory response. Two hours after LPS injection, VPA600 animals secrete more corticosterone to the blood than control mice, and show an increase in the levels of expression of proinflammatory cytokines in the spleen. After LPS challenge, VPA600 mice also show signs of increased neuroinflammation compared with control mice: they have more microglial cells in the hippocampus, and they show higher levels of proinflammatory cytokines in the cerebellum. Our results provide evidence of basal neuroinflammation and an altered inflammatory response in the VPA model of autism. We propose that this model can be used to evaluate the contribution of inflammatory reactivity to autism-related behaviors. These studies will contribute to elucidate the role of the inflammatory alterations observed in ASD individuals. *Autism Res* 2013, ••: ••–••. © 2013 International Society for Autism Research, Wiley Periodicals, Inc.

**Keywords:** valproic acid; cytokines; microglia; astroglia; hypothalamus–pituitary–adrenal axis; behavior

## Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are characterized by an impairment in social interactions, communication deficits, and restricted repetitive and stereotyped interests and behaviors [American Psychiatric Association, 2000]. The number of individuals diagnosed with ASD has increased in recent years, and it is reported to be as high as 9 per 1000 newborns [Centers for Disease Control and Prevention, 2009; Rutter, 2005]. Due to this increase in the prevalence of ASD and the general aging of society, it can be expected that the number of adult individuals with ASD will increase significantly in the next 20 years. However, most clinical and experimental studies have focused on the early processes that contribute to ASD symptoms, and only few reports are aimed at understanding the biological life-lasting alterations in ASD, and how they contribute to the pathophysiology of autism.

Both peripheral and brain inflammation have been associated with autism [reviewed in Depino, 2013; Onore, Careaga, & Ashwood, 2012; Patterson, 2011]. These immune alterations are not restricted to the perinatal period, but they seem to persist throughout life. Periph-

eral blood mononuclear cells and lymphoblasts from autistic children secrete more proinflammatory cytokines (particularly IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) both basally [Malik et al., 2011] and after stimulation with bacterial endotoxin component lipopolysaccharides (LPS) [Jyonouchi, Sun, & Le, 2001] when compared with controls. Moreover, postmortem studies have shown that ASD subjects present neuroinflammation in various regions of the brain [Vargas, Nascimbene, Krishnan, Zimmerman, & Pardo, 2005], and that the neocortical transcriptome of autistic individuals reflects a strong immune response [Garbett et al., 2008]. However, the causes and consequences of these immune alterations have not been extensively explored.

Cytokines modulate normal neuronal function and behavior [Yirmiya & Goshen, 2011], and the bidirectional communication between the immune system and the brain is essential for the appropriate physiological and behavioral responses to infection [McCusker & Kelley, 2013]. However, chronic peripheral inflammation and abnormal inflammatory responses in the brain can lead to cognitive dysfunction, prolonged sickness behavior, and depression-like behavior. We can then hypothesize

From the Institute for Physiology, Molecular Biology and Neurosciences, CONICET-UBA, and Department of Physiology, Molecular and Cellular Biology, FCEyN, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Received March 19, 2013; accepted for publication September 3, 2013

Address for correspondence and reprints: Amaicha Mara Depino, Institute for Physiology, Molecular Biology and Neurosciences, CONICET-UBA. Int. Guiraldes S/N, Ciudad Universitaria, Pabellon 2, 2do piso, C1428EHA, Buenos Aires, Argentina. E-mail: adepino@conicet.gov.ar

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/aur.1338

© 2013 International Society for Autism Research, Wiley Periodicals, Inc.

that altered inflammatory function and chronic glial activation in ASD could at least in part be responsible for the characteristic alterations in behavior observed.

ASD individuals are prone to suffer from chronic gastrointestinal disturbances [Hornig et al., 2008; Parracho, Bingham, Gibson, & McCartney, 2005; Wang, Tancredi, & Thomas, 2011], and these and other long-lasting inflammatory processes could underlie the immune alterations observed in ASD. Alternatively, autistic individuals can have an abnormal immune system, which would in turn make them more prone to chronic infection and autoimmune disorders. Recent studies in mice have shown indeed that maternal immune activation can alter the behavior of the offspring, resulting in reduced sociability and other behaviors related to autism [Malkova, Yu, Hsiao, Moore, & Patterson, 2012]. Moreover, these animals also show immune dysregulation [Hsiao, McBride, Chow, Mazmanian, & Patterson, 2012]. This goes in line with the clinical evidence linking perinatal infection with autism [reviewed in Depino, 2013]. However, other proposed genetic and environmental etiological factors could either affect immune function or make the subjects more susceptible to infection and disease.

Our aim here was to characterize the peripheral and central inflammatory responses in a non-inflammatory model of autism. To this aim, we chose to study the valproic acid (VPA) model of autism in mice. Clinical evidence associated the prenatal exposure to the anti-epileptic drug VPA to a high incidence of autism [Moore et al., 2000]. Following that evidence, different studies have shown that prenatal exposure to 600 mg/kg VPA at the gestational day (GD) 12.5 results in reduced sociability in the rat [Kim et al., 2011; Schneider & Przewlocki, 2005] and in the mouse [Wagner, Reuhl, Cheh, McRae, & Halladay, 2006]. Similarly, children prenatally exposed to VPA showed poor social interaction and communication skills [Moore et al., 2000]. Therefore, this pharmacological treatment is considered to be an animal model of autism, showing construct and face validity.

Here, we used this mouse model to characterize the basal inflammatory state and the response to an acute inflammatory stimulus, both in the periphery and in the brain. We show that animals prenatally exposed to VPA show reduced social interaction and increased anxiety-related behavior in the elevated plus maze (EPM). Moreover, they present evidence of long-lasting glial activation in the hippocampus and the cerebellum, and they respond in an exacerbated way to an inflammatory stimulus.

## Methods

### Animals

BALB/cAnNCr1 (BALB/c, Charles River, Wilmington, MA, USA) and C57BL/6J (C57, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) strains were bred for several genera-

tions in the animal house at the Leloir Institute (Buenos Aires, Argentina). To obtain F1 hybrid offspring, BALB/c females were mated with C57 males at 8–12 weeks of age. Analysis of F1 hybrid mice has been advised due to the facts that they are genetically and phenotypically uniform, and that they possess hybrid vigor [Banbury Conference, 1997]. Each male mouse was bred with one nulliparous female. Female mice were controlled daily and placed in a single cage when a vaginal plug was observed. This day was considered GD0.5. At GD12.5, pregnant mice were injected subcutaneously with 400 or 600 mg/kg of valproic acid sodium salt in saline solution (VPA; Sigma, St. Louis, MO, USA). Control animals were injected with saline solution (CON). The day of parturition was defined as postnatal day (PD) 0. The litters were culled to 10 pups and weaned at PD21 in cages containing four to six animals. Only the male mice were studied. Offspring belonging to the same treatment group were mixed at weaning to reduce the litter effect. Two independent cohorts were used, with a total of 5–6 litters per each prenatal treatment. For each experimental group, 20 mice were studied. To reduce the number of animals used, the response to an inflammatory stimulus was studied in the same groups of animals that were subjected to behavioral analysis.

All animals had water and food *ad libitum* and were housed on a 12:12 light/dark cycle with lights on at 8:00 am. All animal procedures were performed according to the regulations for the use of laboratory animals of the National Institute of Health, Washington, DC, USA (followed by the Leloir Institute).

### Behavioral Testing

Behavioral testing was performed during the light period (between 10:00 and 16:00 hr) under dim light illumination. Mice were 8–10 weeks of age at the beginning of testing. Tests were separated by 1-week intervals to reduce inter-test interactions and performed in the order listed below. Mice were tested in the holding room. After changing illumination, mice were habituated to it for 45 min prior to the test. After testing, each mouse was identified and placed in a holding cage until all animals in a cage were tested. Each apparatus was cleaned with 20% ethanol between sessions. All testing and manual scoring was performed by an experimenter (L.L.) blinded to treatment groups.

The social interaction test was performed as previously described [Depino, Lucchina, & Pitossi, 2011]. Briefly, a 40 × 15 cm black arena divided in three compartments (side compartments: 15 × 15 cm, central compartment: 10 × 15 cm) was used. Openings that measure 7.5 cm connected the central and side compartments. A clear Plexiglass cylinder (7.5 cm of diameter, with several holes to allow nose contact) was placed in each side compart-

ment at the beginning of the test. Animals were placed in the central compartment and allowed to explore for 5 min (habituation). Then, an unfamiliar, young (3 weeks of age) C57 male mouse (social stimulus) was placed in one of the cylinders. Social interaction was evaluated during a 10 min period. The social side was randomly chosen. The amount of time spent in each compartment and locomotion data were collected by a video-tracking system (ANY-maze, Stoelting, IL, USA). The time the subject spent sniffing the social stimulus (nose inside a hole of the cylinder) was recorded manually using a key.

The EPM was performed as previously described [Depino et al., 2011; Depino, Tsetsenis, & Gross, 2008; Lucchina, Carola, Pitossi, & Depino, 2010]. The maze consisted of two open and two closed arms (open arms: 30 × 5 cm, 105 lux, surrounded by a 0.5 cm high border; closed arms: 30 × 5 cm, 43 lux, surrounded by 19 cm high walls). The walls were made of black polyvinyl chloride (PVC) and the floor of gray PVC. The apparatus was elevated 50 cm above the floor. Mice were placed into the central platform (5 × 5 cm, 102 lux) of the maze facing toward an open arm and allowed to explore the maze for 5 min. Locomotion data were collected by the ANY-maze system (Stoelting), and rearing events were scored manually during each session. We measured two parameters of exploration (total distance walked and the number of rearing events) and two anxiety-related variables (time spent in the open arms and percentage of distance in the open arms).

The open field (OF) test was performed as previously described [Depino et al., 2008, 2011; Lucchina et al., 2010]. Mice were placed in an arena (floor: 45 × 45 cm of gray PVC; walls: 30 cm high of black formic; 30 lux) for 5 min. Animals were initially placed along one side of the arena, and the center region was defined as the central 23 × 23 cm area. Locomotion data were collected by the ANY-maze system (Stoelting), and rearing events were scored manually during each session. We analyzed two exploratory variables (total distance walked and the number of rearing events) and two anxiety-related parameters (time spent in the center and percentage of distance in the center).

The novel object recognition test was performed as previously described [Depino et al., 2008, 2011]. Time exploring each object was measured during each session (orientation of the animal toward the object with its nose within 1 cm of the object for a minimum of 1 sec), using the ANY-maze software (Stoelting).

The tail suspension test was performed as previously described [Depino et al., 2011]. Animals were suspended in the air using adhesive tape wrapped around the subject's tail (about 4/5 from the base) and fixed to a wire at 25 cm of height from a wooden surface. The time spent immobile was measured during 5 min. Animals that learned how to climb their own tails during the test were removed from the analysis.

The forced swimming test was performed as previously described [Depino et al., 2011]. Subjects were gently placed in a beaker glass (diameter, 15 cm; height, 25 cm), filled with 14 cm of water at room temperature (25°C). The time spent immobile during 5 min was measured with a stopwatch. At the end of the test, animals were dried with a paper towel, and they were placed in a holding cage with normal bedding. Mice were dry after 20 min.

#### *Adult LPS Challenge*

One week after the last behavioral test, animals from each prenatal treatment were randomly assigned to two experimental groups: LPS or saline (adult treatment). Animals were injected intraperitoneally either with 25 µg/kg LPS (*Escherichia coli* LPS, serotype 0111:B4, Sigma) or with sterile saline solution (Sal). Two hours after the injection, animals were deeply anesthetized and sacrificed. We chose this time as it was previously shown to be the peak of blood corticosterone levels after LPS injection [Pitossi, del Rey, Kabiersch, & Besedovsky, 1997]. All LPS and saline injections occurred between 9:00 and 10:00 am to avoid the effect of corticosterone circadian variations. For corticosterone and cytokines analysis, trunk blood was collected from the heart, and then the spleen and brain tissues (hippocampus and cerebellum) were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. For immunohistochemical analysis, animals were perfused as it is described below. To evaluate whether VPA can activate the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, we injected 600 mg/kg VPA or saline solution, we collected trunk blood 2 hr after injection, and we performed radioimmunoassay (RIA) as described.

#### *Corticosterone RIA*

RIA was performed on plasma samples as previously described [Lucchina et al., 2010]. Trunk blood samples were centrifuged, and the plasma was removed and stored at –20°C until RIA was performed. Corticosterone was extracted twice from plasma, using 500 µL and 300 µL of ether, respectively, and resuspended in 100 µL of buffer B (0.05 M Tris pH 8, 0.1 M NaCl, 0.1% sodium azide and 0.1% BSA). The assay was carried out following the RIA protocol provided by the anti-corticosterone antibody manufacturer (C8784, Sigma) using <sup>3</sup>H-corticosterone (1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-corticosterone, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). The lower limit of detection of the assay was 12.5 pg corticosterone.

#### *Real-Time RT-PCR*

RNA isolation and reverse transcription were performed as previously described [Depino, Ferrari, Pott Godoy, Tarelli,

& Pitossi, 2005]. Comparative quantitation by real-time RT-PCR was performed for each cytokine using the SYBR-green I fluorescence method, with Rox as passive reference dye [Depino et al., 2011]. Stratagene MxPro™ QPCR software and Stratagene Mx3005P equipment were used (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Primers and product size are presented in Table 1. A standard curve was performed for each molecule alongside with the samples, and used to transform Ct values to cDNA dilution values. cDNA levels of cytokines were then normalized with the cDNA level of  $\beta$ 2-microglobulin in the same sample. We used  $\beta$ 2-microglobulin as house-keeping gene because its expression was not altered by the treatments (data not shown). Results were confirmed by normalization with  $\beta$ -actin, with the exception of the hippocampus, where this house-keeping gene showed effects of both prenatal and adult treatments (data not shown). All samples were run in triplicate. Specificity was controlled by melting curves and electrophoresis in agarose gels. Values are expressed as percentage of the CON-Sal group.

#### Immunohistochemistry

Animals were deeply anesthetized and transcardially perfused with heparinized saline followed by cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.2). After removing the brains, they were placed in the same fixative for 4–5 hr at 4°C. Then, the brains were cryoprotected by immersion in 30% sucrose, frozen in isopentane, and 40  $\mu$ m-thick serial sections were obtained in a cryostat. The brains were sectioned in the coronal plane, whereas the cerebella were sectioned in the sagittal plane.

For immunohistochemical identification of microglial and astroglial cells, every 12th section (each 440  $\mu$ m apart) was processed as previously described [Depino et al., 2011]. Briefly, free-floating sections were treated with 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 min, and nonspecific protein binding was blocked by the incubation with 1% normal donkey serum in Tris-buffered saline (TBS) for 1 hr (containing 1% of triton for microglia and 0.1% for astroglia). Sections were incubated with primary antibodies rat anti-mouse CD11b (1:500, Serotec, Oxford,

UK) or rabbit anti-gial fibrillary protein (GFAP) (1:700, DAKO, Glostrup, Denmark), overnight at room temperature. Anti-rat and anti-rabbit biotinylated secondary antibodies (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) followed by Vectastain standard ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) were used. For each brain structure, three sections per animal were analyzed for each marker.

#### Stereological Analysis

Stereological quantifications were performed by an observer (L.L.) blinded to the treatment using a Nikon Eclipse E600 microscope and a CX900 video camera (MicroBrightField Inc., Williston, VT, USA), with the aid of the Stereo Investigator image analysis software (MicroBrightField Inc.). The optical fractionator method [West, Slomianka, & Gundersen, 1991] was employed to estimate the number of microglial cells in the cerebellum, and in the molecular layer, granular cell layer, and hilus of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. Zones were delineated with the tracing function of the Stereo Investigator software using a 10  $\times$  magnification objective (0.4 NA), according to a mouse brain atlas [Paxinos & Franklin, 2001]. A preliminary population estimate was performed to determine the desired parameters. We used a 50  $\times$  50  $\times$  10  $\mu$ m counting frame and a 150  $\times$  150  $\mu$ m sampling grid to analyze the cerebellum, and a 70  $\times$  70  $\times$  9  $\mu$ m counting frame and a 200  $\times$  200  $\mu$ m sampling grid for the various areas of the hippocampus. Guard zones were 2  $\mu$ m. The CD11b-positive cells were counted using a 60X oil lens, following the unbiased sampling rule [Howard & Reed, 2005], and included in the measurement when they came into focus within the optical dissector. The cellular body size was measured with the Nucleator probe. Five isotropic rays were used to determine the soma volume. For the analysis, the number and volume of cells and the volume of the brain region were taken into account for each animal and averaged per group.

#### Estimation of GFAP-Positive Area

Sections were analyzed under an Olympus microscope (Center Valley, PA, USA), and digital images were obtained

**Table 1. Primers Used in Real-Time RT-PCR Analyses and Expected Product Sizes**

Molecule	5' primer	3' primer	Product size
IL-1 $\beta$	TTGACGGACCCCAAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCTCTCA	204
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTCCAGGTAGCTATGG	208
TNF- $\alpha$	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	212
TGF- $\beta$ 1	TGACGTCACCTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTCTGGATGGTGC	170
$\beta$ 2m	TGACCGGCTGTATGCTATC	CAGTGTGAGCCAGGATATAG	222

using a 10 × magnification lens, with an Infinity2 camera and the Infinity Capture software (Lumera Corporation, Ottawa, ON, Canada). The percentage of the area immunoreactive for GFAP was measured in digital images with the aid of the ImageJ software [Rasband, 1997–2009] as previously described [Depino et al., 2011]. Briefly, the threshold was manually set so that all immunostained cells were selected. Then, the percentage of the area occupied by astrocytes was measured in each region studied.

### *Stereotaxic Injections*

Adult male mice were anesthetized with ketamine chlorhydrate (80 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). Ten micrograms of LPS in 1 µL were administered with a 50-µm tipped finely drawn glass capillary. Control mice received 1 µL of saline solution. The stereotaxic coordinates were as follows: bregma, -6.9 mm; ventral, -1 mm. For lobules VI–VII, we leveled the skull by aligning the tooth bar to the ear bars. For lobules IV–V, we adjusted the tooth bar 3 mm lower than the ear bars. Eight animals per group were injected.

Animals were kept in a cage placed over a heating pad until they woke up. Twenty-four hours after injection, mice were evaluated in the social interaction test and weighed. After testing, animals were perfused and their cerebella analyzed for glial activation as previously described. We verified the site of injection in each animal using Nissl-stained tissue and removed from the analysis those animals in which the corresponding lobule was not targeted.

### *Statistical Analysis*

Statistical analysis was performed with the aid of the Statistica software (version 7, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's multiple comparisons test. In all cases, statistical significance was assumed where  $P < 0.05$ . Data are presented as mean ± SEM.

## **Results**

### *Prenatal Exposure to VPA Results in Autism-Related Behaviors*

In order to characterize the effects of prenatal exposure to VPA on the inflammatory response, we first confirmed the behavioral phenotype of the model by comparing control mice (CON) with mice exposed to 600 mg/kg VPA (VPA600, a dose previously shown to result in reduced social interaction) and with mice exposed to a lower dose of 400 mg/kg (VPA400). We observed no effect of VPA treatment on the length of gestation or on the

number of pups per litter (data not shown). Moreover, unpublished data from our lab shows that VPA does not alter maternal behavior, and we found that all mice gained weight similarly during the first postnatal week [weight at PD7, CON  $3.87 \pm 0.19$  g, VPA400  $4.30 \pm 0.15$  g, VPA600  $3.93 \pm 0.11$  g; ANOVA  $F(2, 57) = 2.269$ ,  $P = 0.113$ ]. In summary, we found no strong effect of VPA on mice development.

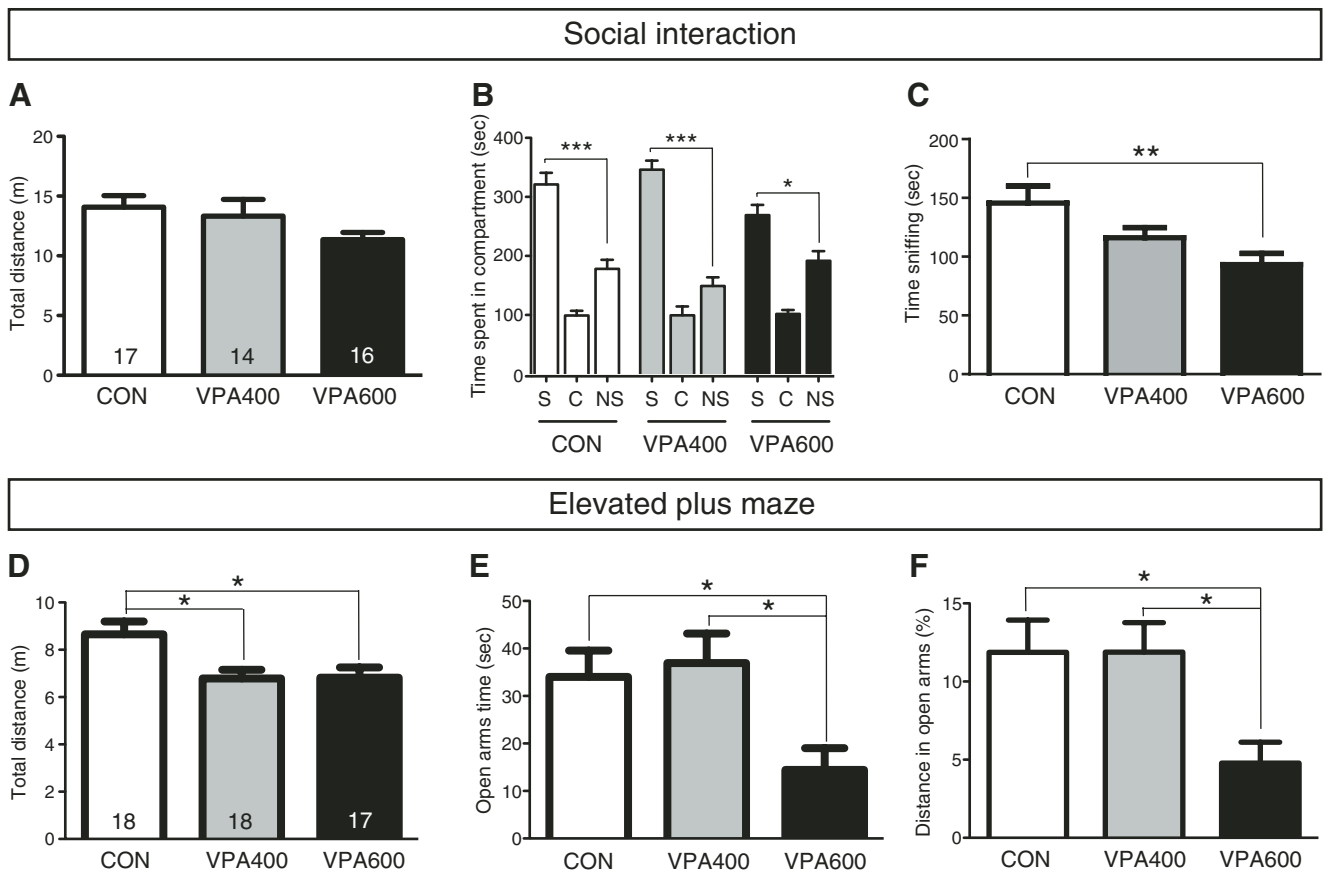
When mice reached adulthood (at the eighth postnatal week), we started the behavioral analysis.

**Social interaction deficits.** All animals showed the same levels of total locomotion in the social interaction test (SI), both in the habituation stage [ $F(2, 44) = 2.498$ ,  $P = 0.094$ ] and in the social interaction stage [ $F(2, 44) = 2.011$ ,  $P = 0.146$ ; Fig. 1A]. Although all animals showed preference for the social compartment during the social interaction stage (Fig. 1B), we observed a significant effect of prenatal treatment with VPA on the time that animals spent interacting with the stimulus mouse [ $F(2, 44) = 5.447$ ,  $P = 0.008$ ], with VPA600 animals spending less time sniffing the stimulus than CON mice (Fig. 1C). This effect was not due to a general neophobic response, as VPA600 and CON mice responded in a similar manner to a novel object in the novel object recognition test [time exploring the novel object, CON  $136.2 \pm 9.5$  sec, VPA600  $126.9 \pm 13.3$  sec,  $t(30) = 0.554$ ,  $P = 0.583$ ]. A lower VPA dose (400 mg/kg) showed an intermediate response in the time spent sniffing the stimulus mouse (Fig. 1C).

**Anxiety-related behavior.** As mood disorders and anxiety disorders show a high comorbidity with ASD [American Psychiatric Association, 2000; Hofvander et al., 2009], we also studied anxiety- and depression-related behaviors in mice exposed to VPA. To assess anxiety-related behavior, we performed the EPM and the OF tests. For the EPM, ANOVA showed that VPA400 and VPA600 offspring walked less [ $F(2, 50) = 5.565$ ,  $P = 0.007$ ; Fig. 1D]. Moreover, VPA600 showed less vertical explorations [CON  $11.50 \pm 1.02$ , VPA400  $13.78 \pm 1.16$ , VPA600  $8.88 \pm 1.25$ ;  $F(2, 50) = 4.536$ ,  $P = 0.016$ ]. VPA600 mice spent less time in the open arms [ $F(2, 50) = 4.551$ ,  $P = 0.015$ ; Fig. 1E] and showed a reduced percentage of distance walked in the open arms [ $F(2, 50) = 5.066$ ,  $P = 0.010$ ; Fig. 1F].

For the OF, ANOVA showed no differences between groups in the total distance walked, the time spent in the center, or the percentage of distance walked in the center. Only a significant effect on the number of vertical explorations was observed, with VPA400 and VPA600 showing a significantly reduced number of events [CON  $33.26 \pm 1.95$ , VPA400  $25.37 \pm 1.92$ , VPA600  $24.44 \pm 1.55$ ;  $F(2, 53) = 7.107$ ,  $P = 0.002$ ]. In summary, VPA600 mice showed an increased anxiety-related phenotype in the EPM, but not in the OF.





**Figure 1.** Prenatal exposure to valproic acid (VPA) results in increased autism- and anxiety-related behaviors in adult mice. In the social interaction test, animals show similar levels of exploration during the social interaction test (A) and preference for the social compartment (B), but they spend less time sniffing the social stimulus (C). VPA-exposed mice also show increased anxiety-related behavior in the elevated plus maze (EPM): VPA 400 and VPA600 animals explore less the EPM (D), and VPA600 mice spend less time (E) and walk less (F) in the open arms. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Tukey's multiple comparison test. Mean  $\pm$  SEM. Ns are shown in each bar. S, social compartment; C, central compartment; NS, non-social compartment.

**Depression-related behavior.** We evaluated immobility in the forced swimming and tail suspension tests, a variable that is affected by rodent treatment with antidepressant drugs and which has been interpreted as “behavioral despair.” VPA600 mice spent the same amount of time immobile in these tests when compared with CON mice [forced swimming test, CON  $231.5 \pm 5.5$  sec, VPA600  $231.1 \pm 3.2$  sec,  $t(31) = 0.064$ ,  $P = 0.949$ ; tail suspension, CON  $90.6 \pm 8.3$  sec, VPA600  $116.4 \pm 16.5$  sec, Welch-corrected  $t(23) = 1.398$ ,  $P = 0.175$ ].

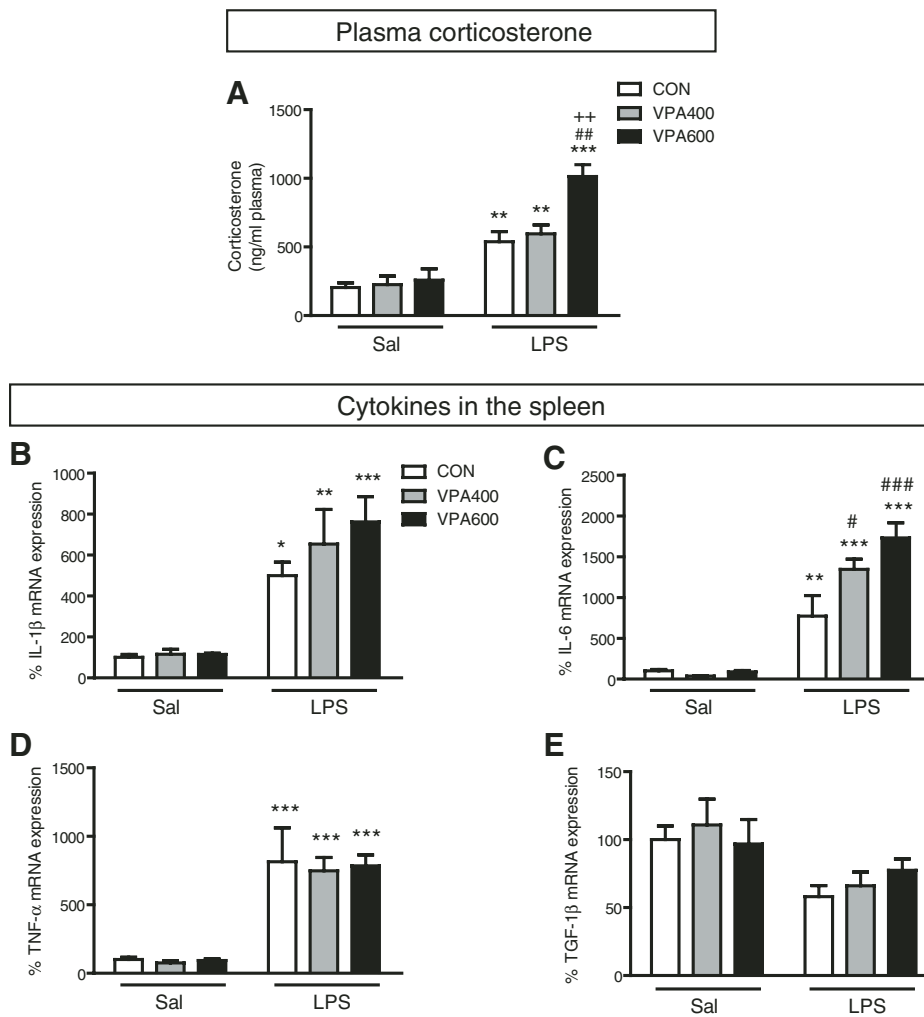
#### *Mice Prenatally Exposed to VPA Show an Exacerbated Peripheral Inflammatory Response to LPS*

To examine whether the prenatal exposure to VPA could induce changes in the peripheral inflammatory response, we injected LPS or saline intraperitoneally in adult animals (adult treatment) and we evaluated the inflammatory response 2 hr later. Intraperitoneal injection of

LPS has been extensively used to mimic bacterial infection, and has been widely used to study acute inflammatory responses in the periphery and in the brain [Pitossi et al., 1997]. In particular, we measured plasma corticosterone levels and the expression of cytokines in the spleen (a classical peripheral site of cytokine production).

Two-way ANOVAs were performed with prenatal treatment (three levels: CON, VPA400, and VPA600) and adult treatment (two levels: Sal and LPS) as independent variables. We observed an interaction between prenatal and adult treatments in the levels of plasma corticosterone [ $F(2, 20) = 5.874$ ,  $P = 0.009$ ]. For Sal animals, there were no differences in the levels of corticosterone between VPA-exposed and CON adult offspring. The injection of LPS activated the HPA axis in all animals, but this response was exacerbated in VPA600 mice (Fig. 2A).

As it has been shown that prenatal inflammatory stimuli can result in long-lasting alterations in behaviors related to ASD [Malkova et al., 2012], that and early life



**Figure 2.** Mice prenatally exposed to valproic acid (VPA) show increased peripheral responses to an inflammatory stimulus. (A) Lipopolysaccharide (LPS) activates the hypothalamus–pituitary–adrenal axis, but the amount of plasma corticosterone is higher in VPA600 mice.  $N = 4\text{--}5$  per group. In the spleen, LPS increases the expression of proinflammatory cytokines and reduces the expression of the anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$ 1. All animals show increased levels of IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), and TNF- $\alpha$  (D) upon LPS challenge. The increase of IL-6 was exacerbated in VPA-exposed mice. There was a general reduction in the levels of TGF- $\beta$ 1 after LPS challenge (E).  $N = 4\text{--}6$  per group. Tukey's multiple comparison test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. the corresponding Sal group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs. CON-LPS group; ++ $P < 0.01$  vs. VPA400-LPS group. Mean  $\pm$  SEM.

inflammation can also result in altered HPA function [Shanks et al., 2000], we asked whether VPA could actually elicit an inflammatory response in mice. To test for this, we injected adult mice with 600 mg/kg of VPA or saline solution, and collected trunk blood 2 hr after injection. We found no effect of VPA on the levels of plasma corticosterone [Saline  $64.2 \pm 13.2$  ng/mL, VPA  $83.7 \pm 41.7$  ng/mL;  $t(6) = 0.55$ ,  $P = 0.60$ ].

LPS elicited the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in the spleen of all animals [adult treatment effect: IL-1 $\beta$ ,  $F(1, 24) = 52.263$ ,  $P < 0.001$ ; IL-6,  $F(1, 24) = 145.781$ ,  $P < 0.001$ ; TNF- $\alpha$ ,  $F(1, 24) = 79.046$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2B–D] and reduced the expression of TGF- $\beta$ 1 [ $F(1, 24) = 10.600$ ,  $P = 0.003$ ; Fig. 2E]. In addition, IL-6 also showed an effect

of prenatal treatment [ $F(2, 24) = 7.434$ ,  $P = 0.003$ ] and an interaction between treatments [ $F(2, 24) = 8.008$ ,  $P = 0.002$ ]. VPA400 and VPA600 mice challenged with LPS showed higher IL-6 mRNA levels in the spleen than CON mice after the inflammatory stimulus (Fig. 2C).

#### *Mice Prenatally Exposed to VPA Show Signs of Glial Activation and Exacerbated Central Inflammatory Responses to a Peripheral LPS Challenge*

We analyzed the effect of prenatal VPA exposure and adult LPS challenge on the extent of astroglial and microglial activation in two brain regions linked to autism-related behaviors in the mouse (namely, social

interaction and repetitive behaviors): the hippocampus [Depino et al., 2011] and the cerebellum [DeLorey, Sahbaie, Hashemi, Homanics, & Clark, 2008; Martin, Goldowitz, & Mittleman, 2010]. In a preliminary study, we evaluated which area within each structure to quantify, considering whether qualitative differences were observed and if the structure showed a homogeneous pattern of glial cells or if it was more appropriate to create subdivisions. In all cases, two-way ANOVA (prenatal  $\times$  adult treatments) and Tukey's post-hoc tests are reported.

**Hippocampus.** Three different subareas of the DG of the hippocampus were analyzed: the molecular layer, the granular cell layer, and the hilus. In the molecular layer, stereological quantification of microglia showed effects of both prenatal treatment [ $F(2, 15) = 4.032, P = 0.040$ ] and adult treatment [ $F(1, 15) = 8.331, P = 0.011$ ] in a two-way ANOVA. The density of microglial cells in this region was higher in VPA600 than CON mice, when they had been challenged with LPS 2 hr earlier (Fig. 3A and Fig. S1A). The area occupied by astrocytes was also affected by the prenatal [ $F(2, 18) = 4.689, P = 0.023$ ] and the adult treatments [ $F(1, 18) = 10.889, P = 0.004$ ]. There was a general increase in the GFAP-positive area in animals challenged with LPS (Fig. 3E). In the granular cell layer of the DG, we observed an effect of adult treatment on the density of microglial cells [ $F(1, 15) = 7.277, P = 0.017$ ]. VPA600 mice injected with LPS showed a tendency to increased number of microglial cells when compared with VPA600 animals injected with saline ( $P = 0.051$ ; Fig. 3B). In this region, we observed the effects of both prenatal [ $F(2, 18) = 3.599, P = 0.048$ ] and adult treatments [ $F(1, 18) = 29.712, P < 0.001$ ] on the extension of the GFAP-positive area. In VPA400 and VPA600 mice, the LPS challenge increased the area occupied by astrocytes, something that was not observed in CON-LPS mice (Fig. 3F). In the hilus, the analysis of microglia showed effects of both prenatal [ $F(2, 15) = 6.879, P = 0.008$ ] and adult treatments [ $F(1, 15) = 7.720, P = 0.014$ ]. Only VPA600 mice showed increased microglial cell density upon a peripheral LPS challenge (Fig. 3C). In this region, the area occupied by astrocytes was only affected by the adult treatment [ $F(1, 18) = 21.337, P < 0.001$ ]. There was a general increase in the GFAP-positive area after LPS injection that reached statistical significance for the VPA400 group (Fig. 3G and Fig. S2A).

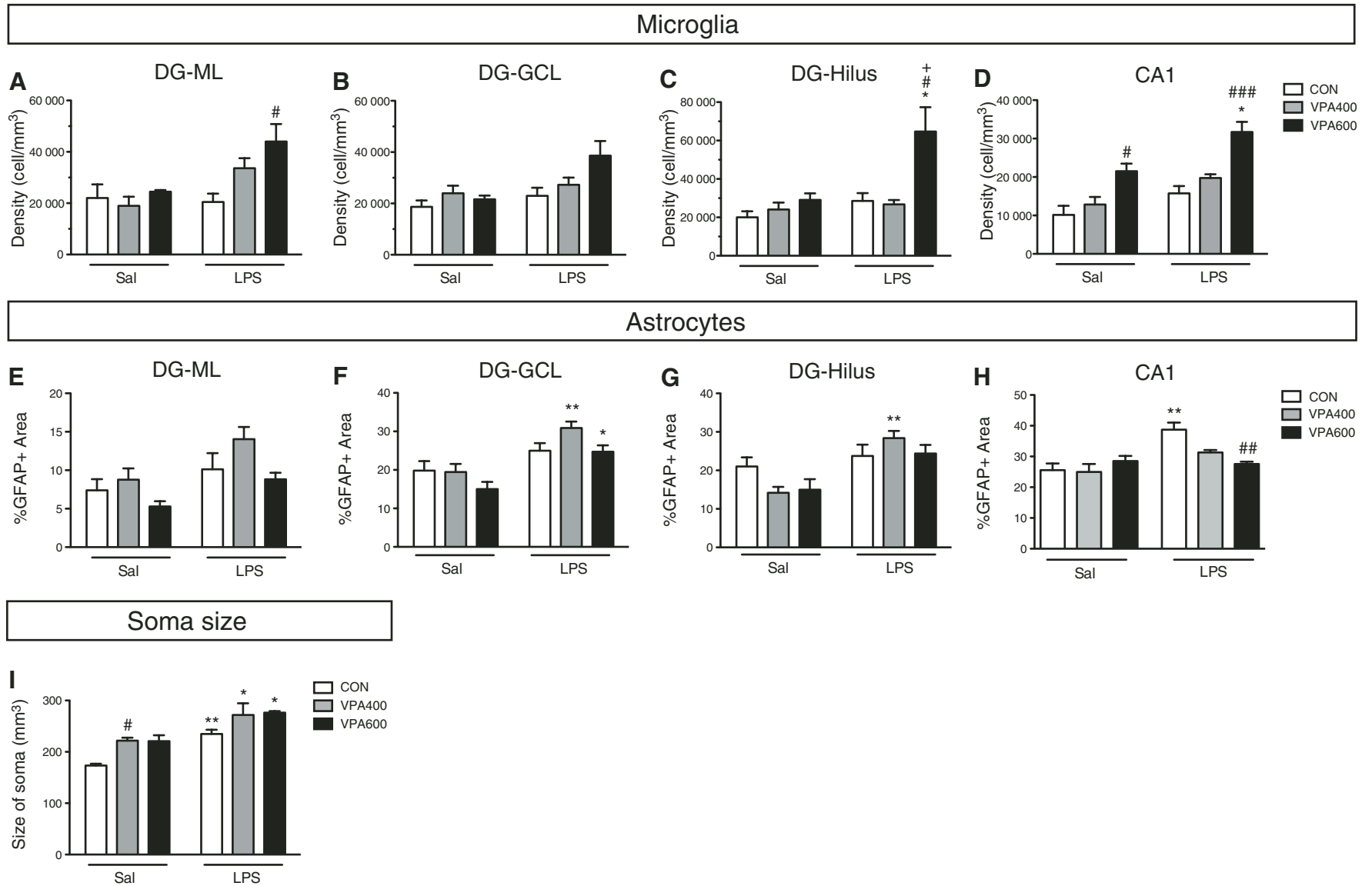
In the CA1 of the hippocampus, the density of microglial cells was affected by both the prenatal [ $F(2, 15) = 22.135, P < 0.001$ ] and the adult treatments [ $F(1, 15) = 18.650, P < 0.001$ ]. Prenatal exposure to 600 mg/kg VPA resulted in more microglial cells in this region, and the adult challenge with LPS further augmented the number of these cells in these animals (Fig. 3D and

Fig. S1B). In the CA1, the percentage of GFAP-positive area showed an interaction between prenatal and adult treatments [ $F(2, 18) = 7.407, P = 0.004$ ]. CON mice showed an increase in the GFAP-positive area after the injection of LPS in adulthood, but in VPA400 and VPA600 animals this effect was not observed (Fig. 3H and Fig. S2B).

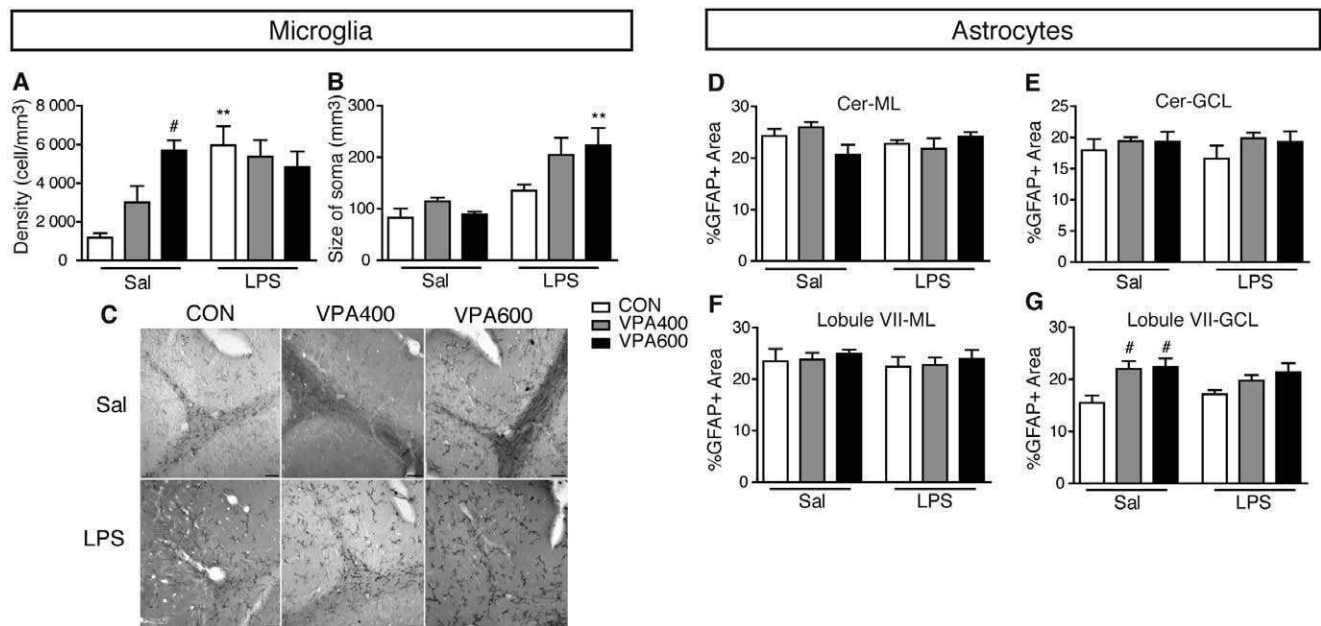
When we analyzed the size of the soma of microglial cells present in the hippocampus, we observed that both the prenatal [ $F(2, 15) = 12.308, P < 0.001$ ] and the adult treatments [ $F(1, 15) = 45.456, P < 0.001$ ] affected this parameter. Prenatal exposure to 400 mg/kg VPA and adult LPS challenge increased the size of the microglial cell body (Fig. 3I), suggesting that these stimuli turn these cells to a more activated state.

**Cerebellum.** Microglial cells showed a homogeneous distribution through the molecular, granular, and pyramidal layers of the cerebellum, and they were mostly excluded from the white matter. For this reason, the white matter was not included for quantification, and the other layers were stereologically sampled for estimation of microglial cell number. We observed an interaction between prenatal and adult treatments [ $F(2, 18) = 5.849, P = 0.011$ ] in the density of microglial cells in the cerebellum. VPA600-Sal mice showed higher density of microglial cells than CON-Sal animals (Fig. 4A and C). When animals were challenged with LPS, we detected a significant increase in the number of these cells in CON animals. However, after LPS, all animals showed similar densities of microglial cells, suggesting that the effects of prenatal and adult treatments were not additive, or that there is a ceiling effect that prevents further increases in VPA600 mice. However, the size of the soma was only affected by the adult treatment [ $F(1, 18) = 27.676, P < 0.001$ ]. LPS significantly increased the size of the microglial cells soma in animals prenatally exposed to 600 mg/kg VPA, suggesting activation of these cells in this experimental group (Fig. 4B).

GFAP-positive cells show a very characteristic distribution in the cerebellum: the cell bodies of Bergmann's glial cells are allocated among the cell bodies of Purkinje cells, and they project their processes across the molecular layer. We, therefore, delimited two areas: the molecular layer (including the cell bodies of Bergmann's glial cells) and the granular cell layer. In the molecular layer, a two-way ANOVA showed an effect of the adult treatment on the percentage of area occupied by astrocytes [ $F(1, 17) = 7.815, P = 0.012$ ] due to a general decrease in this area in LPS-injected mice (Fig. 4D). VPA and LPS treatments did not affect the percentage of GFAP-positive area in the granular cell layer (Fig. 4E). We then studied whether the analysis of the whole cerebellum was obscuring alterations in the GFAP-positive area in specific



**Figure 3.** Mice prenatally exposed to valproic acid (VPA) show increased glial activation in the hippocampus. Stereological analysis of the number of microglial cells (CD11-positive) in the dentate gyrus (DG) (A–C) and the CA1 (D) of the hippocampus show that there is an increase in the number of these cells in animals prenatally exposed to VPA and challenged with lipopolysaccharides (LPS) in adulthood. LPS tends to increase the size of the soma of microglial cells in the hippocampus (I). The percentage of GFAP-positive area in the DG (E–F) and in the CA1 (H) shows that astroglial cells are less affected by treatment in the hippocampus.  $N = 3-4$  per group. Tukey's multiple comparison test:  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs. the corresponding Sal group;  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#\#P < 0.001$ ,  $\#\#\#\#P < 0.0001$  vs. the corresponding CON group;  $+P < 0.05$  vs. the corresponding VPA400 group. Mean  $\pm$  SEM.



**Figure 4.** Mice prenatally exposed to valproic acid (VPA) show increased glial activation in the cerebellum. VPA animals have more microglial cells in the cerebellum (A), and these cells show a more activated morphology upon the lipopolysaccharide challenge (B). In (C), we show representative images of immunohistological staining with antibody against CD11b in the lobule VII. Scale bar: 100  $\mu$ m. No differences on the percentage of GFAP-positive area were observed in the molecular layer (ML, D) or the granular cell layer (GCL, E) of the cerebellum. When the analysis was circumscribed to lobule VII, no differences among groups were observed in the ML (F), but VPA-exposed animals showed an increment on this area (G).  $N = 3-4$  per group. Tukey's multiple comparison test:  $**P < 0.01$  vs. the corresponding Sal group;  $\#P < 0.05$  vs. the corresponding CON group. Mean  $\pm$  SEM.

lobules of this structure. When we analyzed the area occupied by astrocytes in the different lobules, we observed a significant interaction between treatments in the granular cell layer of lobule VII [ $F(2, 17) = 8.747$ ,  $P = 0.002$ ] due to an increase in this value in animals prenatally exposed to VPA (Fig. 4G and Fig. S3). This effect was not observed in the molecular layer (Fig. 4F), and no differences were observed in the other lobules (data not shown).

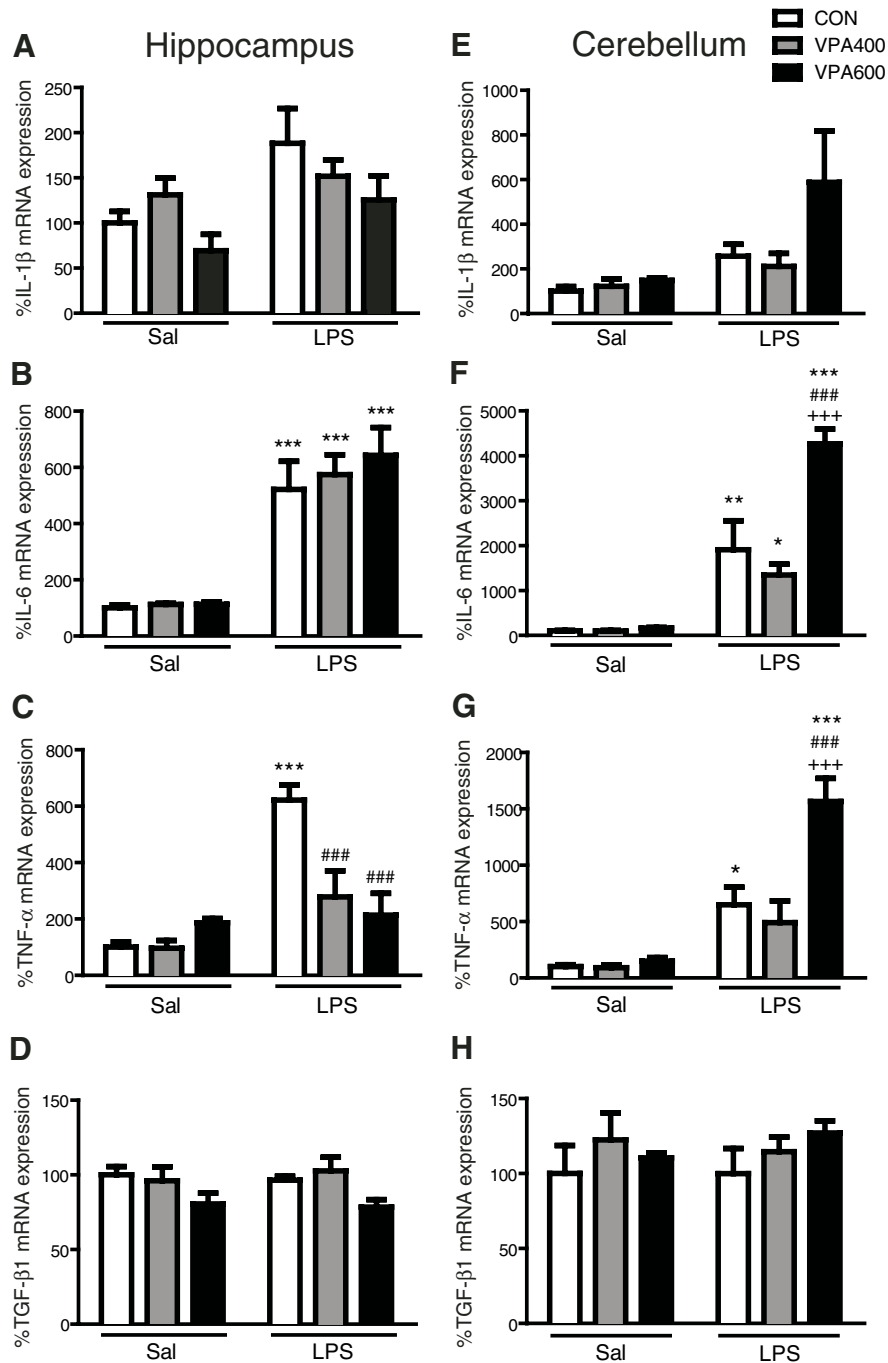
#### Analysis of Cytokine Expression in the Brain of Mice Prenatally Exposed to VPA after a Peripheral Challenge with LPS

To further characterize the glial activation in our model, we analyzed the expression of cytokines in the hippocampus and the cerebellum, both in unchallenged animals and upon the peripheral challenge with LPS. Previous reports have shown that peripheral LPS can induce cytokine expression in the brain [Pitossi et al., 1997]. In all cases, two-way ANOVA (prenatal  $\times$  adult treatments) followed by Tukey's post-hoc test were performed.

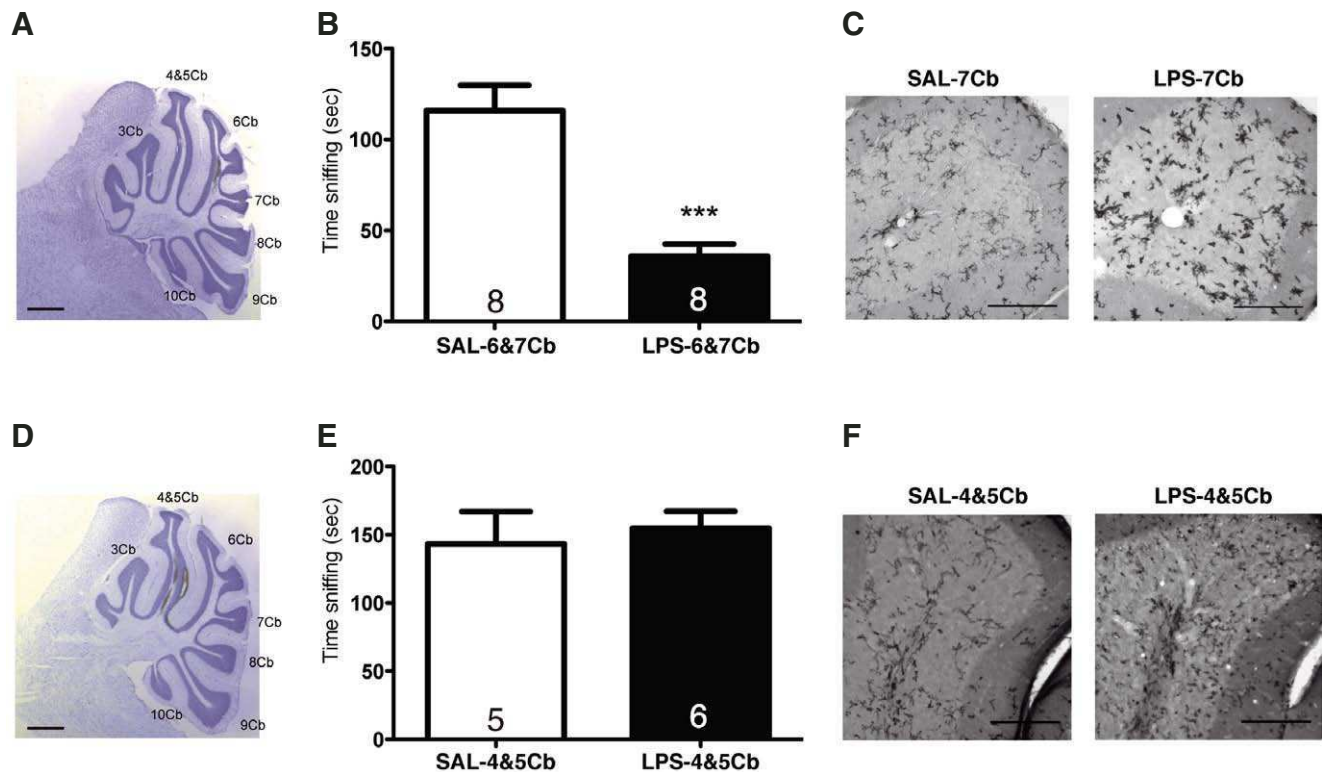
In the hippocampus, IL-1 $\beta$  and IL-6 expression showed an effect of adult treatment [IL-1 $\beta$ ,  $F(1, 24) = 9.431$ ,  $P = 0.005$ ; IL-6,  $F(1, 24) = 93.954$ ,  $P < 0.001$ ]. LPS-injected animals showed an increase in the expression of these cytokines, an effect that was more evident

for IL-6 (Fig. 5A and B). TNF- $\alpha$  expression showed a different profile, evidencing an interaction between treatments [ $F(2, 22) = 13.682$ ,  $P < 0.001$ ]. CON animals showed a significant increase of hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression when they were injected with LPS in adulthood, while this effect was blunted in VPA-exposed animals, both in VPA400 and VPA600 mice (Fig. 5C). For the anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$ 1, we found a general effect of prenatal treatment [ $F(2, 21) = 4.826$ ,  $P = 0.019$ ], with VPA600 animals expressing reduced levels of this cytokine regardless of the adult treatment (Fig. 5D).

In the cerebellum, IL-1 $\beta$  expression showed an effect of adult treatment [ $F(1, 23) = 7.300$ ,  $P = 0.013$ ], particularly evident in VPA600 mice (Fig. 5E). Indeed, VPA600-LPS mice showed a tendency to increased IL-1 $\beta$  expression, when compared with VPA600-Sal group ( $P = 0.053$ ). IL-6 and TNF- $\alpha$  expression showed similar profiles in the cerebellum. We observed interactions between prenatal and adult treatments for both cytokines [IL-6,  $F(2, 23) = 16.044$ ,  $P < 0.001$ ; TNF- $\alpha$ ,  $F(2, 23) = 10.371$ ,  $P < 0.001$ ]. The increase in cerebellar IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression upon LPS challenge was exacerbated in VPA600 mice (Fig. 5F and G). TGF- $\beta$ 1 expression in the cerebellum was not affected by neither prenatal nor adult treatments (Fig. 5H).



**Figure 5.** Expression of cytokines in the brains of mice prenatally exposed to valproic acid (VPA): effect of a peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ 1 mRNA levels in the hippocampus and cerebellum were determined 2 hr after an LPS challenge. Real-time PCR values are expressed as a percentage of CON-Sal mice. IL-1 $\beta$  expression is not altered in the hippocampus (A), and it showed a tendency to augment in VPA600-LPS group in the cerebellum (E). LPS induces the expression of IL-6 in the hippocampus (B) and in the cerebellum (F), where VPA600 animals show an exacerbated response. Peripheral LPS induces TNF- $\alpha$  expression in both brain regions in CON mice. This increase is prevented in the hippocampus (C) and exacerbated in the cerebellum (G) of VPA600 animals. No differences in the expression of TGF- $\beta$ 1 are observed in the analyzed regions (D and H).  $N = 4-6$  per group. Tukey's multiple comparison test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. the corresponding Sal group; ### $P < 0.001$  vs. the corresponding CON group  $P < 0.001$  vs. the corresponding VPA400 group. Mean  $\pm$  SEM.



**Figure 6.** Effect of lipopolysaccharide (LPS) injection into the cerebellum on social interaction. Lobules VI–VII (A) or IV–V (D) were targeted by stereotaxic injections (injections of India ink are shown in Nissl-stained cerebella). The injection of 10  $\mu$ g LPS into the lobules VI–VII of the cerebellum resulted in reduced social interaction (B) and increased activation of microglial cells in the injected lobules (C, representative photographs of lobule VII with anti-CD11b immunohistochemistry). Stereotaxic injection of 10  $\mu$ g LPS into the lobules IV–V of the cerebellum did not affect social interaction levels (E), although this treatment resulted in activated microglia in the injected lobules (F, representative photographs of lobule IV–V with anti-CD11b immunohistochemistry). Student's *t*-test: \*\*\* $P < 0.001$ . Mean  $\pm$  SEM. Ns are shown in each bar. Cb, cerebellar lobule. Scale bar in A and D, 1 mm; in C and F 150  $\mu$ m.

#### *Induction of Microglia Activation in the Lobules VI–VII by Intra-Cerebellar LPS Results in Reduced Social Interaction in the Adult Mouse*

To evaluate whether the observed neuroinflammation in the adult cerebellum of VPA-exposed mice could underlie the phenotype of reduced social exploration, we stereotaxically injected adult mice with 10  $\mu$ g of LPS or saline into the lobules VI–VII of the cerebellum (Fig. 6A–C). Twenty-four hours after LPS injection, animals showed reduced social interaction (Fig. 6B;  $t_{14} = 5.150$ ,  $P < 0.0001$ ). This effect was not due to a general sickness behavior, as LPS- and saline-injected animals showed similar levels of activity during the test (Sal-6&7Cb,  $42.0 \pm 3.7$  visits, LPS-6&7Cb,  $35.0 \pm 4.0$  visits;  $t_{14} = 1.280$ ,  $P = 0.221$ ) and lost a similar percentage of body weight 24 hr after surgery (Sal-6&7Cb,  $5.1 \pm 0.8\%$ , LPS-6&7Cb,  $6.3 \pm 0.7\%$ ;  $t_{14} = 1.061$ ,  $P = 0.307$ ).

We then evaluated the neuroinflammatory state of microglia in these animals using the categories described previously [Depino et al., 2011; Kreutzberg, 1996]. Microglia in the lobules VI–VII of LPS-injected mice

showed a highly activated morphology (Fig. 6C, right):  $38.25 \pm 0.12\%$  of the cells presented a macrophage-like morphology (type IV) and  $53.75 \pm 0.12\%$  of the microglia showed an active (type II/III) morphology ( $N = 4$ ). Conversely, microglial cells present in lobules VI–VII of animals injected with saline (Fig. 6C, left) mainly showed a typically inactive (type I) morphological appearance ( $99.4 \pm 0.01\%$ ,  $N = 5$ ).

The effect of cerebellar inflammation on social interaction is specific of lobules VI–VII, as the injection of LPS into lobules IV–V (Fig. 6D–F) did not result in a reduction of sociability 24 hr after (Fig. 6E;  $t_9 = 0.664$ ,  $P = 0.664$ ), although microglia in these lobules was activated upon LPS injection (Fig. 6F).

#### **Discussion**

In this work, we show for the first time that mice prenatally exposed to VPA present long-lasting alterations in both peripheral and brain inflammatory responses. Animals prenatally exposed to VPA have normal

corticosterone plasma levels in adulthood. This is in agreement with different clinical studies showing normal cortisol levels in children and adults with ASD [Corbett, Mendoza, Abdullah, Wegelin, & Levine, 2006; Spratt et al., 2012]. However, the normal increase in the concentration of this hormone upon an inflammatory challenge is significantly higher in VPA600 animals than in the CON and VPA400 groups, indicating a hyperreactivity of the HPA axis. Different studies aimed at characterizing the HPA response in children and adults with ASD showed that autistic individuals have increased HPA responses when faced with social and environmental stressors [Corbett et al., 2006; Spratt et al., 2012]. However, these findings do not take into consideration that stressors related to novel experiences and social interactions, which may not be considered as stressful by most individuals, may be especially stressful for those with autism. Accordingly, increased responses could be due to altered perception of stimuli as threatening rather than to an altered HPA function. Here, we chose to evaluate the effect of an immunological stressor to circumvent this possible confounding effect, and verified that indeed the HPA axis function is enhanced in animals prenatally exposed to VPA.

To further characterize the inflammatory response in VPA-exposed animals, we analyzed the expression of proinflammatory cytokines in the spleen, a major lymphoid organ. Ashwood and colleagues showed that higher plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-12p40 are associated with highly impaired stereotypical behaviors in ASD [Ashwood et al., 2011], although other studies show normal levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in ASD children [Croonenberghs, Bosmans, Deboutte, Kenis, & Maes, 2002]. In our mouse model, we failed to detect differences in the basal levels of expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, or TNF- $\alpha$ . The 25  $\mu$ g/kg LPS challenge resulted in an increase of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  expression in the spleen 2 hr after the injection, in agreement with a previous report that shows that the expression of these cytokines in the spleen peaks 2 hr after LPS injection [Pitossi et al., 1997]. Interestingly, IL-6 expression after LPS challenge is significantly higher in animals prenatally exposed to VPA than in control mice. Therefore, our results are consistent with previous reports of increased innate immune activity in ASD patients [Jyonouchi et al., 2001]. Moreover, peripheral blood monocytes obtained from ASD children showed increased production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  when stimulated with the TLR2 ligand LTA, and increased production of IL-1 $\beta$  when stimulated with the TLR4 ligand LPS, when they were compared with the response of cells obtained from age-matched control children [Enstrom, Onore, Van de Water, & Ashwood, 2010]. Whether our mouse model also shows dissimilar patterns of response to particular inflammatory stimuli needs to be further investigated.

Proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  are of special interest in the study of neuroimmunological contributions to psychiatric disorders because they not only act in the periphery but can also increase the neuroinflammatory response and affect brain function. In a first attempt to evaluate the effect of prenatal VPA on glial cells and on the neuroinflammatory response to a peripheral inflammatory challenge, we analyzed the number of microglial cells and the percentage of area occupied by astroglial cells in two brain structures relevant to autism. VPA increased the number of microglial cells in the CA1 of the hippocampus and in the cerebellum. To our knowledge, this is the first report of such a long-term effect of VPA on microglial cells. Different mechanisms could mediate this effect: VPA exposure could alter the proliferation of microglial cells and/or favor the migration of circulating monocytes to the brain parenchyma in these regions during development. Alternatively, VPA treatment could alter glial and/or neuronal function, and neuroinflammation could be elicited in response to this chronic malfunction later in life. Future work will be aimed at determining if this increase in microglia density is observed early in the postnatal brain, or whether it is manifested only later in adulthood.

Our results are in agreement with different postmortem analyses that show microglial activation in different regions of the autistic brain [Morgan et al., 2010; Suzuki et al., 2013; Tetreault et al., 2012; Vargas et al., 2005]. Again, those analyses do not distinguish between early involvement of microglia in ASD and microglial response to other processes taking place in the autistic brain. Our results support the prenatal VPA exposure protocol as a valuable mouse model to evaluate the role and effects of neuroglial alterations on social behavior.

We further tested whether the exacerbated inflammatory response observed in the periphery following LPS injection was also evident in the response of glial cells. In fact, we found that after exposure to LPS, VPA600 mice presented more microglial cells in the molecular layer and the hilus of the DG, and in the CA1 region of the hippocampus than CON mice, lending support to this hypothesis. In the cerebellum, LPS increased the number of microglial cells in CON mice to levels similar to those of the unchallenged VPA600 mice. However, the failure to detect an exacerbated response in VPA600 mice in the cerebellum could be due to a ceiling effect, which precluded us from detecting higher levels of microglial cell activation by measuring proliferation. In line with this, the soma of microglia from the cerebellum of VPA600-LPS mice was larger than that of CON-LPS mice, suggesting their activation. Moreover, in all brain regions and experimental groups, LPS increased the size of microglial cell soma, suggesting activation of these cells. The area occupied by astrocytes, on the other hand, did not show the clear pattern of activation expected for an



exacerbated response to LPS in VPA600 mice. In the cerebellum, astrocytes occupied a larger area in the granular cell layer of lobule VII in both VPA400 and VPA600 mice. Previous work has linked alterations of the normal development of this lobule with reduced sociability in the mouse [DeLorey et al., 2008; Shi et al., 2009], and a reduced size of vermal lobules VI and VII has been found in autistic individuals [Courchesne, Yeung-Courchesne, Press, Hesselink, & Jernigan, 1988].

In addition, we analyzed the expression of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , and the anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$ 1, in the same brain structures where glial activation was studied. Remarkably, we found different patterns of expression for each cytokine analyzed. IL-1 $\beta$  only showed a tendency to increase in the cerebellum of VPA600 mice exposed to LPS. The inflammatory stimulus augmented the expression of IL-6 in both brain regions in all experimental groups, but the increment was significantly higher in the cerebellum of VPA600 mice. TNF- $\alpha$  expression was induced 2 hr after LPS injection in both brain regions in CON mice. However, the effect on mice prenatally exposed to VPA was region-specific. VPA600 mice showed an exacerbated response in the cerebellum, but a significantly reduced response in the hippocampus. Finally, none of the experimental groups presented changes in the levels of expression of TGF- $\beta$ 1. We have previously shown a differential effect of TGF- $\beta$ 1 on autism-related behaviors depending on whether it was overexpressed in the young or the adult hippocampus [Depino et al., 2011]. Future work should address whether the expression of this cytokine (along with others) is altered in the postnatal brain in the VPA model, and whether an early neuroinflammatory state also contributes to the behavioral alterations observed in the VPA mouse model of autism.

The different cytokine expression patterns observed after a peripheral LPS stimulus in the brain could be accounted for in part by the fact that we analyzed a single time point after injection. A previous study has shown that IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  mRNA levels have different patterns of expression in different brain regions [Pitossi et al., 1997]. Despite this, we clearly observe an exacerbated cytokine expression response in the cerebellum, a region that also shows signs of neuroinflammation at the cellular level. On the contrary, VPA600 mice have more microglial cells and a larger GFAP-positive area in the hippocampus, but the pattern of expression of cytokines in this region does not support an exacerbated response. Further studies will help elucidate the functional consequences of this disparity in the neuroinflammatory state of animals exposed to VPA, and whether there are further consequences when these animals are exposed to stressful stimuli, such as a peripheral inflammogen later in life. This is particularly relevant due to the increased inci-

dence of infection and autoimmune diseases in ASD, which could have an impact on glial function with ensuing consequences on behavior.

As a first attempt to evaluate whether microglial activation in the adult brain can modulate social interaction, we induced microgliosis by stereotaxically injecting LPS into lobules VI–VII of the cerebellum. This central inflammatory stimulus results in reduced sociability 24 hr after the injection and leads microglial cells to a more activated state. Interestingly, sociability is not affected when the LPS is injected in lobules IV–V, stressing the role of cerebellar lobules VI–VII on sociability [Courchesne et al., 1988; DeLorey et al., 2008; Shi et al., 2009]. Future work blocking microglia activation in the brain of VPA mice could help elucidate whether the effect of prenatal VPA on sociability occurs through microglial activation in specific brain regions.

As the behavioral alterations of the VPA model have been previously characterized in various mice and rat strains, our study was mainly focused on repeating those results in an F1 hybrid (C57 x Balb) offspring, a valuable tool to study gene–environment interactions using genetically modified mice [e.g. Carola, Frazzetto, & Gross, 2006]. Our results add to previous work in diverse mouse and rat strains, showing that the reduction in social interaction after prenatal exposure to VPA is a robust response that does not depend on animal genetic background. Similarly, the neuroinflammatory alterations observed in this work need to be verified in other strains to assess the influence of genetic background on this effect of VPA. In particular, our experimental design consists of Balb/c dams and F1 hybrid offspring, and the contribution of these genetic backgrounds to the VPA and inflammatory responses will need to be evaluated by future work.

We measured anxiety- and depression-related behaviors in the F1 hybrid offspring, as mood disorders have a high comorbidity with ASD [American Psychiatric Association, 2000; Hofvander et al., 2009]. To our knowledge, behavioral despair has not been previously analyzed in the VPA model of autism. We found no differences between VPA and CON mice in the tail suspension or forced swimming tests. Although tail suspension and forced swimming tests are not depression models themselves, they are the most reliable tests for assessing antidepressant and/or depression-like behaviors in genetically modified or pharmacologically treated mice [Cryan & Mombereau, 2004]. These results are inconsistent with the high incidence of depression previously reported in individuals with ASD [reviewed in Lainhart, 1999]. Although it has been argued that depression can be difficult to assess in ASD individuals, most studies agree that autistic patients usually present symptoms of depression and respond to antidepressant treatments [Stewart, Barnard, Pearson, Hasan, & O'Brien, 2006]. The lack of depression-related behavior shows

then that the VPA model fails to reproduce this feature of ASD. However, we cannot rule out that the previous behavioral tests could affect the results obtained when evaluating depression-related behavior, as tail suspension and forced swimming tests were the last two tests performed. Moreover, further research could reveal other depression-related behaviors of VPA mice. For example, it would be relevant to evaluate whether VPA-exposed mice are more prone than control mice to develop learned helplessness or depression-like behavior after chronic mild stress, showing then a susceptibility to depression.

The analysis of anxiety-related behavior showed that VPA600 mice explored the open arms of the EPM less than control mice, in agreement with previous reports in CD1 mice [Kataoka et al., 2013] and Wistar rats [Schneider et al., 2008]. However, CD1 mice [Kataoka et al., 2012] did not show the reduction in exploration in the EPM that we observed in the F1 hybrid offspring. In the OF, VPA600 mice showed reduced exploration but no classical anxiety-related behavior (i.e. reduction in the time spent in the center or entries to the center), a behavior that was observed in CD1 mice exposed to VPA [Kataoka et al., 2012]. Although we cannot rule out technical differences that could underlie these discrepancies between the strains [e.g. time between tests was only 1 day in the experiments reported by Kataoka et al., 2012], unpublished data from our group support an alternative interpretation of these results: that the effect of VPA on anxiety-related behaviors is dependent on the genetic background of the animals. Further work is required to test this hypothesis.

All 57 children in the study by Moore and colleagues [Moore et al., 2000] were exposed to VPA during the first trimester of pregnancy, and 51 of them were exposed to anticonvulsants throughout prenatal development. The fact that a single dose of VPA at GD12.5—and not at other gestational ages [Kim et al., 2011]—results in a reduction in sociability in rodents suggests that VPA acts during a critical time window, altering the normal development of the brain circuits regulating this behavior. We hypothesize that there could be a similar critical time window in human development where VPA sensitivity is high, comprised within the chronic exposure period reported by Moore and colleagues.

How an acute exposure to VPA can have long-term consequences on behavior, HPA function, and neuroinflammation still needs to be elucidated. Even though prenatal inflammation can affect both social behavior and immune function in the adult offspring [Hsiao et al., 2012], we showed here that 600 mg/kg VPA does not elicit an inflammatory response in mice, suggesting that VPA acts by at least a partially different mechanism than maternal immune activation. A previous work shows that the effect of prenatal VPA exposure on social behavior is related to its function as a broad-

spectrum inhibitor of histone deacetylases [Kataoka et al., 2012]. Moreover, the same study shows a transient hyperacetylated state of histones 3 and 4 in the brain of VPA-exposed pups. In line with this evidence, we hypothesize that this increase in the levels of acetylation can alter gene expression in the brain, and in turn would alter brain development. So, behavioral alterations and/or neuroinflammation could result from this epigenetic effect of VPA. Future work on epigenetic alterations in animals prenatally exposed to VPA will test this hypothesis.

In summary, our results show that the reduction in social interaction observed in a non-inflammatory mouse model of autism (the VPA model) is accompanied by signs of chronic neuroinflammation and to exacerbated peripheral and central responses to a peripheral inflammatory stimulus. This adds to previous evidence of autism-related behavior and immune alterations in a maternal immune activation mouse model of autism [Hsiao et al., 2012; Malkova et al., 2012]. Moreover, these findings contribute to the face validity of the VPA model, recapitulating the neuroinflammatory and immune alterations observed in ASD individuals. Further work using this model will help elucidate the role of inflammatory factors on the development and expression of autism-related behaviors. An improved understanding of neurobiological factors associated with autism may lead to more effective therapeutic interventions, especially in those individuals that reach adulthood and are continuously exposed to infection.

## Acknowledgments

This work was supported by a CONICET Grant PIP2010-2012, a University of Buenos Aires Grant UBACyT GEF2010-2012, and an ANPCyT Grant PICT2010-1334. A.M.D. is a member of the Research Career of the National Council of Scientific and Technological Research (CONICET), Argentina. L.L. is fellow of the CONICET. We would like to thank Dr. Fernando Pitossi for his support at the beginning of this project and the access to the StereoInvestigation equipment, and Dr. Lucia Chemes for critical reading of the manuscript.

## References

- American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, text revision, (4th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 40–45.

- Banbury Conference. (1997). Mutant mice and neuroscience: Recommendations concerning genetic background. Banbury conference on genetic background in mice. *Neuron*, 19, 755–759.
- Carola, V., Frazzetto, G., & Gross, C. (2006). Identifying interactions between genes and early environment in the mouse. *Genes, Brain, and Behavior*, 5, 189–199.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Prevalence of autism spectrum disorders—Autism and developmental disabilities monitoring network, United States, 2006, surveillance summaries, *MMWR*.
- Corbett, B.A., Mendoza, S., Abdullah, M., Wegelin, J.A., & Levine, S. (2006). Cortisol circadian rhythms and response to stress in children with autism. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 59–68.
- Courchesne, E., Yeung-Courchesne, R., Press, G.A., Hesselink, J.R., & Jernigan, T.L. (1988). Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *The New England Journal of Medicine*, 318, 1349–1354.
- Croonenberghs, J., Bosmans, E., Deboutte, D., Kenis, G., & Maes, M. (2002). Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology*, 45, 1–6.
- Cryan, J.F., & Mombereau, C. (2004). In search of a depressed mouse: Utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*, 9, 326–357.
- DeLorey, T.M., Sahbaie, P., Hashemi, E., Homanics, G.E., & Clark, J.D. (2008). Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: A potential model of autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, 187, 207–220.
- Depino, A., Ferrari, C., Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., & Pitossi, F.J. (2005). Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *Journal of Neuroimmunology*, 168, 96–110.
- Depino, A.M. (2013). Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 53, 69–76.
- Depino, A.M., Lucchina, L., & Pitossi, F. (2011). Early and adult hippocampal TGF-beta1 overexpression have opposite effects on behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 1582–1591.
- Depino, A.M., Tsetsenis, T., & Gross, C. (2008). GABA homeostasis contributes to the developmental programming of anxiety-related behavior. *Brain Research*, 1210, 189–199.
- Enstrom, A.M., Onore, C.E., Van de Water, J.A., & Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24, 64–71.
- Garbett, K., Ebert, P.J., Mitchell, A., Lintas, C., Manzi, B., et al. (2008). Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiology of Disease*, 30, 303–311.
- Hofvander, B., Delorme, R., Chaste, P., Nyden, A., Wentz, E., et al. (2009). Psychiatric and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. *BMC Psychiatry*, 9: 35. doi: 10.1186/1471-244X-9-35
- Hornig, M., Briese, T., Buie, T., Bauman, M.L., Lauwers, G., et al. (2008). Lack of association between measles virus vaccine and autism with enteropathy: A case-control study. *PLoS ONE*, 3, e3140. doi:10.1371/journal.pone.0003140
- Howard, C.V., & Reed, M.G. (2005). *Unbiased stereology*. New York: Garland Science/BIOS Scientific.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Chow, J., Mazmanian, S.K., & Patterson, P.H. (2012). Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 12776–12781.
- Jyonouchi, H., Sun, S., & Le, H. (2001). Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *Journal of Neuroimmunology*, 120, 170–179.
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16, 91–103.
- Kim, K.C., Kim, P., Go, H.S., Choi, C.S., Yang, S.I., et al. (2011). The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters*, 201, 137–142.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19, 312–318.
- Lainhart, J. (1999). Psychiatric problems in individuals with autism, their parents and siblings. *International Review of Psychiatry*, 11, 278–298.
- Lucchina, L., Carola, V., Pitossi, F., & Depino, A.M. (2010). Evaluating the interaction between early postnatal inflammation and maternal care in the programming of adult anxiety and depression-related behaviors. *Behavioural Brain Research*, 213, 56–65.
- Malik, M., Sheikh, A.M., Wen, G., Spivack, W., Brown, W.T., & Li, X. (2011). Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. *Immunobiology*, 216, 80–85.
- Malkova, N.V., Yu, C.Z., Hsiao, E.Y., Moore, M.J., & Patterson, P.H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26, 607–616.
- Martin, L.A., Goldowitz, D., & Mittleman, G. (2010). Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: A model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. *The European Journal of Neuroscience*, 31, 544–555.
- McCusker, R.H., & Kelley, K.W. (2013). Immune-neural connections: How the immune system's response to infectious agents influences behavior. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 84–98.
- Moore, S.J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D.J., et al. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anti-convulsant syndromes. *Journal of Medical Genetics*, 37, 489–497.
- Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., et al. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry*, 68, 368–376.

- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26, 383–392.
- Parracho, H.M., Bingham, M.O., Gibson, G.R., & McCartney, A.L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 987–991.
- Patterson, P.H. (2011). Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*, 17, 389–394.
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- Pitossi, F., del Rey, A., Kabiersch, A., & Besedovsky, H. (1997). Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of Neuroscience Research*, 48, 287–298.
- Rasband, W.S. (1997–2009). ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rutter, M. (2005). Incidence of autism spectrum disorders: Changes over time and their meaning. *Acta Paediatrica*, 94, 2–15.
- Schneider, T., & Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30, 80–89.
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., et al. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 728–740.
- Shanks, N., Windle, R.J., Perks, P.A., Harbuz, M.S., Jessop, D.S., et al. (2000). Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 5645–5650.
- Shi, L., Smith, S.E., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., & Patterson, P.H. (2009). Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23, 116–123.
- Spratt, E.G., Nicholas, J.S., Brady, K.T., Carpenter, L.A., Hatcher, C.R., et al. (2012). Enhanced cortisol response to stress in children in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42, 75–81.
- Stewart, M.E., Barnard, L., Pearson, J., Hasan, R., & O'Brien, G. (2006). Presentation of depression in autism and Asperger syndrome: A review. *Autism*, 10, 103–116.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., et al. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 70, 49–58.
- Tetreault, N.A., Hakeem, A.Y., Jiang, S., Williams, B.A., Allman, E., et al. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42, 2569–2584.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., & Pardo, C.A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, 57, 67–81.
- Wagner, G.C., Reuhl, K.R., Cheh, M., McRae, P., & Halladay, A.K. (2006). A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36, 779–793.
- Wang, L.W., Tancredi, D.J., & Thomas, D.W. (2011). The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, 32, 351–360.
- West, M.J., Slomianka, L., & Gundersen, H.J. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231, 482–497.
- Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 181–213.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Figure S1.** Mice prenatally exposed to VPA show increased microglial activation in the molecular layer of the dentate gyrus of the hippocampus after LPS challenge. Representative images of immunohistological staining with antibody against CD11b in the molecular layer of the dentate gyrus (A, DG-ML) and in the granular cell layer of the dentate gyrus (B, DG-GCL). Scale bar: 20  $\mu$ m.

**Figure S2.** Mice prenatally exposed to VPA show increased microglial activation in the hilus of the dentate gyrus and in CA1 of the hippocampus after LPS challenge. Representative images of immunohistological staining with antibody against CD11b in the hilus of the dentate gyrus (A, DG-hilus) and in the CA1 of the hippocampus (B, CA1). Scale bar: 20  $\mu$ m.

**Figure S3.** Astroglial cells in the hippocampus are less affected by VPA and LPS treatments. Representative images of immunohistological staining with antibody against GFAP in the dentate gyrus (A) and in the CA1 (B). Scale bar: 50  $\mu$ m.

**Figure S4.** Mice prenatally exposed to VPA show increased astroglial density in the lobule VII of the cerebellum. Representative images of immunohistological staining with antibody against GFAP in the lobule VII of the cerebellum. Scale bar: 100  $\mu$ m.